

**Hovedfagsoppgave i cellebiologi for graden
cand. pharm.**

**Uttrykk av gener involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase i
cellesyklus etter strålebehandling av celler fra
livmorhalskarsinomer**

Anne Katrine Hindhammer



Utført ved

**Avdeling for Strålingsbiologi
Institutt for Kreftforskning
Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF**

**Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo**

Høsten 2006

Forord

Denne hovedfagsoppgaven i cellebiologi ble utført ved avdeling for strålingsbiologi, som hører til Institutt for kreftforskning ved Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF, i perioden november 2005 til november 2006. Hovedfaget er en del av graden cand.pharm ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Først vil jeg takke min hovedveileder, Heidi Lyng, for all hjelp med planlegging av forsøk, bearbeiding av data og nyttige tilbakemeldinger under skriveprosessen.

Ved Institutt for kreftforskning vil jeg ellers takke Debbie Svendsrud for hjelp med det praktiske labarbeidet, Trond Stokke og resten av gruppen for molekylær strålingsbiologi for gode innspill og kritikk på gruppemøter, og internveileder Kirsten Skarstad for hjelp med tilrettelegging og kommentarer til oppgaven.

Eli Caspersen utførte også sitt hovedfag på denne gruppen dette året. En del av arbeidet med oppgaven er gjort i samarbeid med henne. Jeg vil benytte anledningen til å takke henne for samarbeid og støtte hele året, og å takke henne og medstudent Håvard Kirkevold for godt sosialt samvær i løpet av hovedfaget.

Til slutt vil jeg takke min samboer Mats, for all din tålmodighet og oppmuntringen du har gitt meg gjennom hele prosessen.

Oslo, november 2006

Anne Katrine Hindhammer

Sammendrag

Oppgaven er en del av et forskningsprosjekt som har som mål å forbedre strålebehandlingen hos pasienter med livmorhalskreft (cervix-cancer). Det er i tidligere undersøkelser funnet store variasjoner i respons på denne viktige behandlingsformen. Høyt uttrykk av et gen involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase i cellyklus, *CKS2*, er forbundet med den dårlige responsen. Det er ønskelig å undersøke hva disse forskjellene i respons skyldes, og om de kan manipuleres. Kartleggingen ble startet i denne oppgaven. Et modellsystem for livmorhalskreft som baserer seg på cellelinjer fra henholdsvis plateepitelkarsinom og adenokarsinom fra cervix, SiHa og HeLa, ble brukt.

Målene for oppgaven var:

- Etablere to cellelinjer fra cervix for strålebiologiske studier, og undersøke forskjeller mellom dem. Her inngår bestemmelse av vekstprofil, evne til kolonidannelse, strålerespons og eventuelle forskjeller i genuttrykk.
- Studie av genekspresjon etter bestråling for *CKS2* og en del andre gener involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase i cellyklus (*PLK1*, *CCNB2*, *CCNB3* og *CDC2*).

De to cellelinjene hadde noe forskjellig vekstprofil. Det ble funnet en doblingstid på 1,4 dager for SiHa og 0,9 dager for HeLa. Cellenes evne til kolonidannelse ble målt ved å bestemme plating efficiency (PE). Gjennomsnittlig PE ble bestemt til 45,4 % for SiHa og 48,6 % for HeLa. Ved undersøkelse av strålerespons hadde SiHa signifikant høyere overlevelseshastighet enn HeLa ved nesten alle de testede stråledosene, noe som viste at HeLa er mer strålefølsom enn SiHa. For å studere eventuelle forskjeller i genuttrykk mellom de to cellelinjene ble det utført mikromatriseeksperimenter på ubehandlede celler fra begge linjene. Det ble funnet 58 gener som var differensielt uttrykt. Av interessante differensielt uttrykte gener kan *MYC*, *TNFS7*, *S100P*, *INHBB*, *KLF6* og *RASSF1* nevnes. Det ble i tillegg funnet kromosomale områder der flere gener var differensielt uttrykte (11q, 16q og 17q).

Genuttrykket bestemte tidspunkter etter bestråling for utvalgte gener involvert i G₂/M-overgangen i cellyklus ble undersøkt ved hjelp av kvantitativ RT-PCR. Genuttrykket ble bestemt relativt til uttrykket hos en referanse, som bestod av ubestrålte celler. Samtlige av de undersøkte genene i begge cellelinjene viste tendens til oppgang en halv time etter bestråling,

men oppgangen var ikke signifikant i noen av tilfellene ($P > 0,14$). De videre endringene i uttrykk etter stråling var også relativt like for de utvalgte genene. Etter oppgangen sank det målte transkriptnivået for alle genene i tidsrommet mellom 4 og 8 timer etter bestråling. *PLK1* viste størst nedgang i begge cellelinjene, med henholdsvis over seks ganger reduksjon i nivå i SiHa og over tre ganger reduksjon i HeLa. I SiHa viste genene *PLK1*, *CCNB2* og *CDC2* signifikant nedgang i uttrykk ($P < 0,05$), mens for HeLa ble det funnet en slik reduksjon for *PLK1*, *CKS2*, *CCNB2* og *CCNB3*. Etter nedgangen i genuttrykk i perioden mellom 4 og 8 timer økte nivået igjen i begge cellelinjene. Ved tidspunktet 48 timer etter bestråling var ingen av de målte nivåene hos SiHa signifikant forskjellige fra nivået til ubestrålte celler. I motsetning til hos SiHa, var målingene for alle de undersøkte genene forskjellig fra nivået til referansen hos HeLa. Det er tidligere vist at celler arresterer i G₂-fasen i cellesyklus etter behandling med ioniserende stråling, og at denne arresten er forbigående. At cellene stanset i denne fasen av cellesyklus, kan ha sammenheng med den observerte reduksjonen i genuttrykk for de undersøkte genene i denne oppgaven. Dersom disse genene som regulerer inngangen til mitosen ikke ble uttrykt, mistet cellen signalet som kreves for inngang til denne neste fasen i cellesyklus. Når uttrykket av disse genene økte igjen, begynte cellene å proliferere, og arresten ble opphevet.

Innholdsfortegnelse

FORORD	II
SAMMENDRAG.....	III
FORKORTELSER OG SYMBOLER	VII
INNLEDNING.....	- 1 -
1 TEORETISK BAKGRUNN.....	- 3 -
1.1 CELLULÆRE PROSESSER	- 3 -
1.1.1 DNA, DNA-helixen og oppbygning av kromosomene.....	- 3 -
1.1.2 Overføring av genetisk informasjon	- 4 -
1.1.3 Regulering av gentranskripsjon.....	- 4 -
1.1.4 Cellesyklus.....	- 5 -
1.1.5 Regulering av cellesyklus	- 7 -
1.1.6 Regulering av overgangen mellom G ₂ - og M-fase.....	- 8 -
1.2 KREFT OG KREFTUTVIKLING	- 9 -
1.3 LIVMORHALSKREFT	- 10 -
1.3.1 Forekomst og statistikk.....	- 11 -
1.3.2 HPV-virusets betydning for utviklingen av livmorhalskreft.....	- 11 -
1.3.3 Stadier av livmorhalskreft.....	- 11 -
1.3.4 Diagnose og behandling av livmorhalskreft.....	- 12 -
1.4 IONISERENDE STRÅLING	- 13 -
1.4.1 Røntgenstråling	- 13 -
1.4.2 Strålerespons	- 13 -
1.5 MIKROMATRISETEKNIKKEN	- 16 -
1.5.1 Produksjon av prober og trykking av mikromatriser.....	- 17 -
1.5.2 Merking av genmateriale for analyse	- 17 -
1.5.3 Hybridisering.....	- 18 -
1.5.4 Scanning	- 18 -
1.5.5 Bildeanalyse	- 18 -
1.5.6 Datapreprosessering og analyse	- 20 -
1.6 KVANTITATIV RT-PCR.....	- 20 -
1.6.1 Prinsipp for teknikken.....	- 20 -
1.6.2 Beregning av relativt genuttrykk fra kvantitative RT-PCR målinger.....	- 22 -
2 MATERIALER OG METODER	- 23 -
2.1 CELLELINJER	- 23 -
2.2 CELLEDYR KING OG CELLEBEHANDLING	- 23 -
2.2.1 Dyrking.....	- 23 -
2.2.2 Tillaging av celleduspensjon.....	- 24 -
2.2.3 Frysing.....	- 24 -
2.2.4 Tining.....	- 24 -
2.2.5 Celletelling ved hjelp av Coulter counter	- 24 -
2.2.6 Bestråling av celler.....	- 25 -
2.3 VEKSTFORSØK	- 25 -
2.4 KOLONIDANNELSE	- 26 -
2.5 STRÅLEFØLSOMHET	- 26 -
2.6 GENEKSPRESJONSSTUDIER	- 27 -
2.6.1 RNA-isolering.....	- 27 -
2.6.2 Mikromatriseeksperimenter.....	- 27 -
2.6.3 Kvantitativ real time-polymerase chain reaction (RT-PCR)	- 29 -
2.7 ANALYSE AV EKSPERIMENTER	- 30 -
2.7.1 Analyse av mikromatrisedata	- 30 -
2.7.2 Analyse av kvantitativ RT-PCR data.....	- 30 -
2.8 STATISTISK ANALYSE AV RESULTATER	- 31 -
2.8.1 Kolonidannelsesdata	- 31 -
2.8.2 Strålefølsomhetsdata	- 31 -
2.8.3 Kvantitativ RT-PCR-data.....	- 31 -

3 RESULTATER.....	- 32 -
3.1 VEKSTFORSØK	- 32 -
3.2 KOLONIDANNELSE	- 34 -
3.3 STRÅLERESPONS	- 35 -
3.4 GENEKSPRESJONSSTUDIER.....	- 36 -
3.4.1 RNA-isolering.....	- 36 -
3.4.2 Mikromatriseforsøk	- 36 -
3.4.3 Kvantitativ RT-PCR.....	- 40 -
4 DISKUSJON.....	- 46 -
4.1 METODISKE ASPEKTER.....	- 46 -
4.1.1 Cellelinjer som modellsystem for kreft	- 46 -
4.1.2 Kolonitellinger.....	- 46 -
4.1.3 Mikromatriseteknikken	- 47 -
4.1.4 Kvantitativ RT-PCR.....	- 47 -
4.2 BIOLOGISKE ASPEKTER	- 48 -
4.2.1 Etablering av cellelinjene.....	- 48 -
4.2.2 G ₂ /M-faseovergangen.....	- 51 -
4.3 VIDERE ARBEID	- 54 -
5 KONKLUSJON.....	- 55 -
REFERANSER.....	- 56 -
VEDLEGG.....	- 62 -

Forkortelser og symboler

ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutert, protein involvert i strålerespons
ATR	Ataxia telangiectasia og Rad3 relatert, protein involvert i strålerespons
<i>B2M</i>	Gen som koder for β_2 mikroglobulin
BASE	BioArray Software Environment
CAK	Cdkaktiverende kinase
<i>CCNB</i>	Gen som koder for cyklin B
<i>CDC2</i>	Gen som koder for cyklinavhengig kinase CDC2
CDC25C	Protein involvert i regulering av cellyklus
Cdk	Cyklinavhengig kinase
CDKN1A (p21)	Protein involvert i cellyklusregulering
cDNA	Komplementær DNA til mRNA
CHK1	Protein involvert i strålerespons
CHK2	Protein involvert i strålerespons
<i>CKS2</i>	Gen som koder for CKS2, protein involvert i regulering av cellyklus
Ct	Threshold cycle (Ved hvilken amplifikasjonssyklus i RT-PCR fluorescensintensiteten er høy nok til å detekteres)
dH ₂ O	Destillert vann
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoxyribonykleinsyre
dNTP	Nukleotider
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EtOH	Etanol
Gy	Grey (enhet for stråledose)

HCl	Hydrogenklorid (saltsyre)
HPV	Humant papillomavirus
<i>INHBB</i>	Gen som koder for INHBB, protein involvert i cellevekst og differensiering
keV	Kiloelektron-volt
<i>KLF6</i>	Gen som koder for KLF6, protein involvert i cellevekst og differensiering
LiCl	Litiumklorid
ln	Logaritme (naturlig)
log ₁₀	Logaritme (grunntall 10)
log ₂	Logaritme (grunntall 2)
ml	Milliliter
MPF	Mitose promoterende faktor
mRNA	Messenger RNA
<i>MYC</i>	Gen som koder for MYC, protein involvert i cellyklusarrest
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
ng	Nanogram
nm	Nanometer
PBS	Fosfat-bufret saltvannsoppløsning
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Plating efficiency (evne til kolonidannelse)
<i>PLK1</i>	Gen som koder for pololignende kinase 1, involvert i regulering av cellyklus
PMT	Fotomultiplikator
<i>RASSF1</i>	Gen som koder for RASSF1, protein involvert i Rasprotein signal transduksjon
<i>RB1</i>	Gen som koder for RB1, tumor-suppressorgen
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Runder per minutt

	(sentrifugeringshastighet)
rRNA	Ribosomalt RNA
RT-PCR	Real time-PCR
<i>S100P</i>	Gen som koder for S100P, kalsiumbindende protein
SF2	Survival fraction at 2 Gy (overlevelsesfraksjon ved 2 Gy)
SSC-buffer	Natriumklorid/natriumcitrat-buffer
Td	Doblingstid
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
Thr	Threonin (aminosyre)
TIFF	Tagged Image File Format (bildefilformat)
<i>TNFS7</i>	Gen som koder for TNFS7, protein involvert i apoptose
<i>TP53</i>	Gen som koder TP53, tumor-suppressorgen
tRNA	Transfer RNA
Tyr	Tyrosin (aminosyre)
UV	Ultraviolet
WEE1	Protein involvert i regulering av celledyklus
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter

Innledning

Livmorhalskreft er en kreftform som hvert år rammer flere hundretusen kvinner verden over [1,2]. Særlig er kvinner i U-land hardt rammet. Behandlingen av avanserte stadier av denne kreftformen baserer seg hovedsaklig på ioniserende strålebehandling [3,4]. Behandlingen har svært varierende respons [5]. Denne oppgaven er en del av et forskningsprosjekt ved Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF, som har som mål å forbedre strålebehandlingen for pasienter med livmorhalskreft. For å finne en forklaring på forskjellene i strålerespons blant pasientene er det viktig å kartlegge hvordan celler responderer på stråling, og hvilke signalveier som er involvert. Arbeidet med å kartlegge signalveiene involvert i regulering av cellesyklus og strålerespons, er viktig for å i fremtiden kunne rette kreftterapi mot kjente biologiske prosesser, som hvordan kreftceller gjennomgår cellesyklus, og hvordan de responderer på stråleterapi [6]. Ved å utnytte denne kunnskapen kan en gripe inn og påvirke cellens biologiske funksjoner, og slik for eksempel gjøre tumorcellene mer sensitive for stråling. Dette er viktig både for å øke effekten, og for å spesifikt rette behandlingen mot tumorcellene. Slik kan behandlingen av tumorcellene optimaliseres, samtidig som normalvev skånes.

Høyt uttrykk av genet *CKS2* har i forsøk på pasientbiopsier vist å være forbundet med dårlig respons på strålebehandling [7]. Funksjonen til dette genet og proteinet det koder for er lite undersøkt. Det er vist at proteinet binder seg til cyklin/cdk-komplekset som er ansvarlig for inngangen til mitose [8], men hvordan komplekset påvirkes er lite kartlagt. Når celler bestråles med ioniserende stråling kan cellene arrestere i enkelte faser av cellesyklus, blant annet G₂-fasen. En slik arrest kan gjøre cellene i stand til å reparere skaden som oppstår under behandlingen, og fortsette proliferasjonen. Ved å påvirke tiden cellene har til rådighet til reparasjonsprosessen, kan det derfor tenkes at evnen til fortsatt proliferasjon vil kunne endres. Det er derfor ønskelig å kartlegge hva som skjer med uttrykket av *CKS2* og andre gener involvert i overgangen mellom G₂- og M-fasen i cellesyklus etter strålebehandling.

I dette arbeidet ble to cellelinjer fra livmorhalskreft, SiHa og HeLa, benyttet som modellsystem for livmorhalskreft. Det første målet med oppgaven var å etablere cellelinjene for strålebiologiske studier, og å undersøke forskjeller mellom cellelinjene. Det ble bestemt vekstkurver og evne til kolonidannelse for begge cellelinjene. Strålerespons målt som

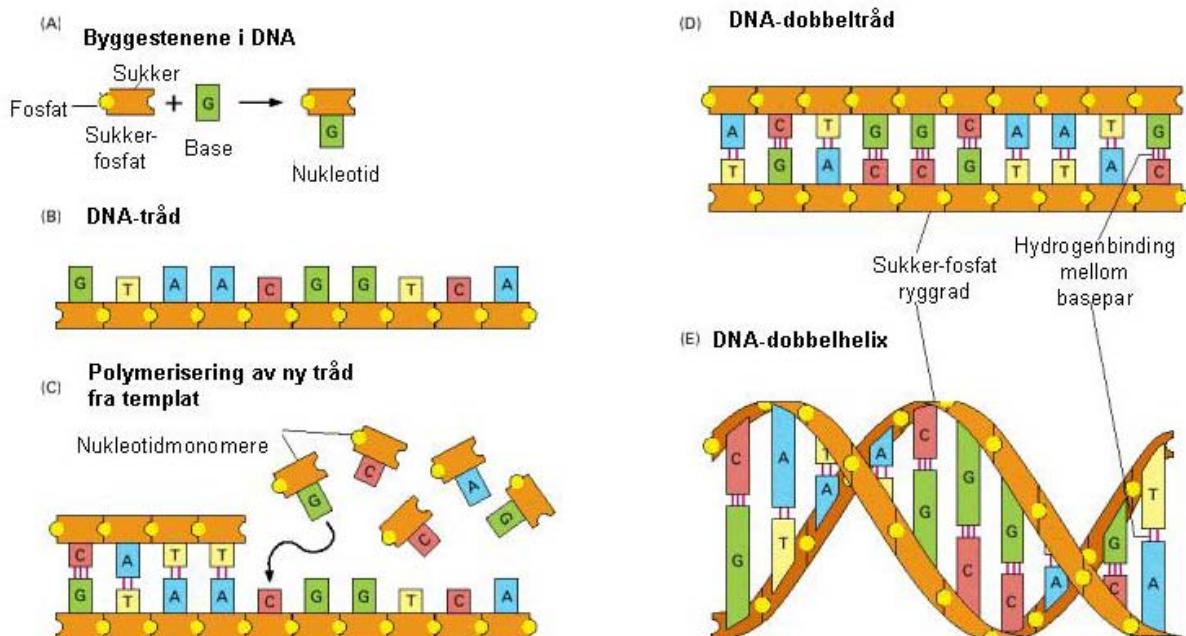
klonogen overlevelse etter bestråling med ioniserende stråling ble studert. Dette innledende arbeidet ble utført i samarbeid med en annen hovedfagsstudent i farmasi. For å undersøke om de to cellelinjene hadde ulikt genuttrykk, ble det utført mikromatriseeksperimenter for ubehandlede celler fra de to cellelinjene. Å kartlegge disse eventuelle forskjellene mellom cellelinjene var viktig for å få et best mulig grunnlag for å vurdere resultater fra studier av blant annet strålerespons. Som nevnt over er *CKS2* involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase i cellesyklus. Det andre målet med denne oppgaven var derfor å undersøke hvordan uttrykket av *CKS2*, og andre gener (*CCNB2*, *CCNB3*, *PLK1* og *CDC2*) involvert i denne overgangen, endres etter behandling med ioniserende stråling. Endringer i uttrykk ble undersøkt ved å bestråle cellene med 8 Gy, og ved hjelp av kvantitativ RT-PCR registrere genuttrykket ved ulike tidspunkter etter stråling.

1 Teoretisk bakgrunn

1.1 Cellulære prosesser

1.1.1 DNA, DNA-helixen og oppbygning av kromosomene

En levende organisme er avhengig av å kunne lagre genetisk informasjon om hvilke prosesser den skal gjennomføre til enhver tid. I mennesker lagres den genetiske informasjonen som DNA, deoksyribonukleinsyre. DNA er bygget opp av nukleotider, som er forbindelser som består av et nukleosid bundet til en eller flere fosfatgrupper. Et nukleosid består igjen av en purin- eller pyrimidinbase bundet til et deoksyribosesuktermolekyl [9]. Polymere av disse nukleotidene bygger opp DNA-kjeden som utgjør menneskets genetiske informasjonslager. Sekvensen av basene i DNA-helixen koder for genene [10]. Genene utgjør oppskriften til proteinene som utøver alle cellens funksjoner. Et DNA-molekyl består av to komplementære kjeder av nukleotider, den såkalte DNA-helixen. Helixen holdes sammen av hydrogenbindinger mellom basene i nukleotidene, mens sukkerfosfatmolekylene utgjør ryggraden i molekylet (Figur 1.1).



Figur 1.1: Oppbygningen av DNA-helixen. (A) viser byggestenen til DNA, nukleotidet. Disse nukleotidene utgjør DNA-tråden (B), som utgjør template for polymerisering (C) til en dobbeltråd (D). Denne dobbeltråden tar form som en dobbelhelix (E) Figur modifisert fra [10].

I eukaryote celler fordeles DNA mellom flere kromosomer. Kromosomene består av en DNA-dobbelhelix og en mengde proteiner som kalles histoner. Histonene er med på å folde og pakke DNA-tråden til en mer kompakt struktur. Alle menneskeceller unntatt kjønnsceller inneholder to kopier av hvert kromosom [10].

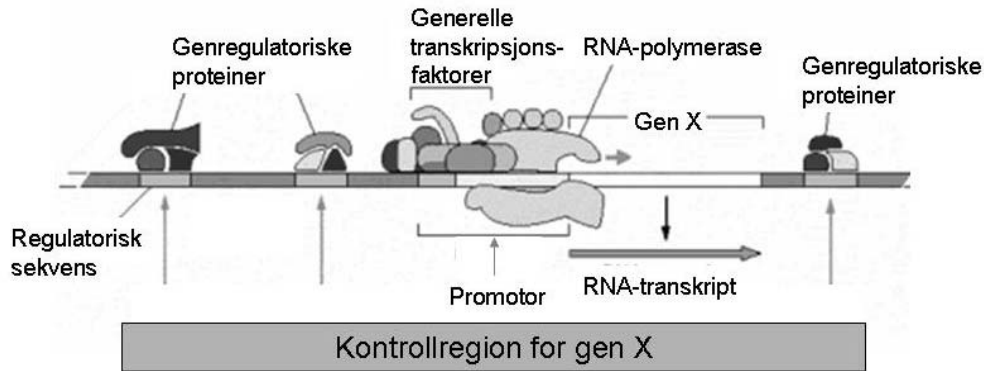
1.1.2 Overføring av genetisk informasjon

Den genetiske informasjonen lagret i genene bestemmer syntesen av proteiner. Proteiner er molekyler som utøver ulike funksjoner i cellen, for eksempel enzymaktivitet, struktur og transport. DNA står ikke direkte for syntesen av proteiner, men indirekte via RNA (ribonukleinsyre). RNA er molekyler som ligner DNA, og syntese av RNA gir en RNA-tråd som er komplementære til DNA-tråden. Når et protein skal produseres transkriberes deler av DNA til RNA ved hjelp av enzymet RNA-polymerase. For å starte gentranskripsjon bindes dette enzymet til bestemte sekvenser i DNA kalt promotorer. RNA kan videre translateres til proteiner, ved at RNA-tråden er bygd opp av såkalte kodon. Hvert kodon består av tre baser fra RNA-tråden og koder for en bestemt aminosyre, som er bestanddeler i proteiner [9].

Det finnes ulike typer RNA i en celle. Det RNA som er involvert i syntesen av proteiner fra DNA kalles messenger RNA, mRNA. Andre typer er transfer RNA, tRNA, og ribosomalt RNA, rRNA. Disse er strukturelle og enzymatiske komponenter i cellen og er involvert i å translatere den genetiske informasjonen til proteiner.

1.1.3 Regulering av gentranskripsjon

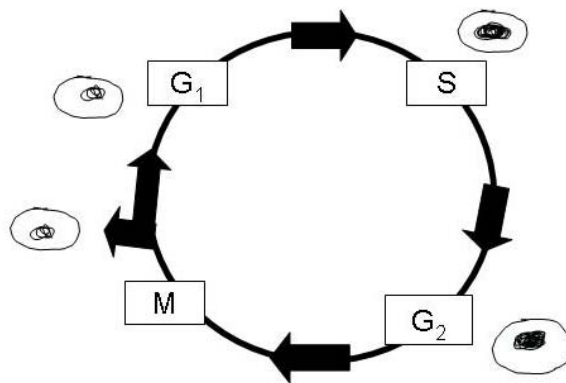
For at DNA skal transkriberes til RNA må cellen få beskjed om hvilke gener som skal uttrykkes. RNA syntetiseres som beskrevet over ved hjelp av enzymet RNA-polymerase. I eukaryote celler er denne polymerasen avhengig av flere faktorer for å binde seg til promotoren og initiere transkripsjonen. Blant annet krever enzymet en rekke generelle transkripsjonsfaktorer [10]. Transkripsjon av RNA reguleres av både aktivatorer og repressorer (Figur 1.2). Aktivatorer er proteiner som skrur på gentranskripsjonen, mens repressorer skrur transkripsjonen av. Disse aktiverende og hemmende proteinene fungerer som en del av cellens komplekse regulering av genekspressjon. Reguleringen avhenger både av cellens indre og ytre miljø, og på denne måten uttrykker cellen kun de proteinene den til enhver tid trenger [10].



Figur 1.2: Kontrollregionen til et typisk eukaryot gen. De generelle transkripsjonsfaktorene og RNA-polymerasen bindes til promotoren, og initierer gentranskripsjon. Transkripsjonen påvirkes også av andre genregulatoriske proteiner, som bindes til regulatoriske sekvenser i DNA. Figur modifisert fra [10].

1.1.4 Cellesyklus

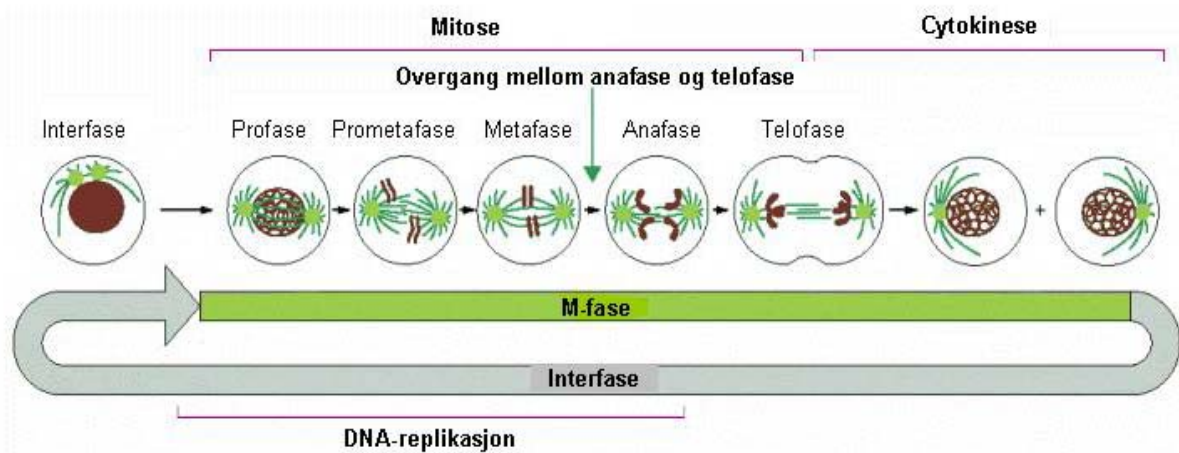
Celler reproduseres ved at cellens innhold dobles, og cellen deretter deles i to. Cellesyklus er denne syklusen av fordobling og deling som celler gjennomgår. I eukaryote celler deles cellesyklus inn i fire faser: M-fase, G_1 -fase, S- fase og G_2 -fase (Figur 1.3) [10,11]. I tillegg til disse fasene kan celler gå inn i en hviletilstand som kalles G_0 (ikke vist her).



Figur 1.3: Cellens fire faser av cellesyklus, G_1 -, S-, G_2 - og M-fase. Ved slutten av M-fasen dannes det to identiske datterceller.

M-fasen består av to deler: mitose og cytokinese. Mitose er prosessen der cellens kjerneinnhold deler seg, mens cytokinese er en prosess som deler den opprinnelige cellen i to

datterceller. M-fasen deles videre inn i følgende steg: Profase, prometafase, metafase, anafase, telofase og cytokinese (Figur 1.4).



Figur 1.4: Illustrasjon av hendelsene i mitose og cytokinese (M-fasen). M-fasen deles videre inn i profase, prometafase, metafase, anafase, telofase og cytokinese. G_1 -, G_2 - og S-fasen utgjør interfase. Figur modifisert fra [10].

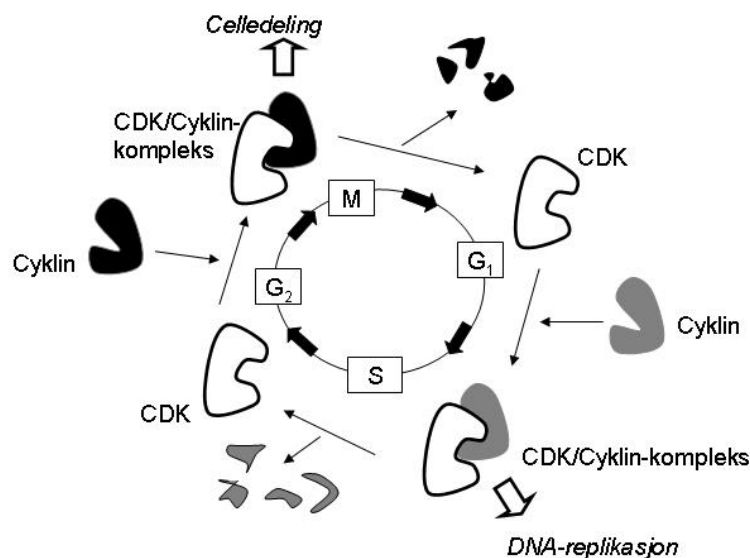
Under profasen kondenseres kromosomene inne i kjernen. Utenfor kjernen beveger centrosomene seg fra hverandre, slik at den mitotiske spindel kan etableres mellom dem. Centrosomene og den mitotiske spindel sørger for å dra kromosomkopiene fra hverandre i mitosen, slik at de to dattercellene får en kopi hver. I prometafase brytes kjernemembranen ned, og de kondenserte kromosomene kan bindes til mikrotubuli i den mitotiske spindel. Når cellen kommer i metafase samles alle de kondenserte kromosomene på linje mellom spindelpolene. Under anafase blir de to kopiene av kromosomene dratt fra hverandre ved hjelp av mikrotubuli og blir til to separate datterkromosomer. Disse dras ytterligere fra hverandre ved at centrosomene flytter seg fra hverandre. Siste fase av delingen av cellens kjerneinnhold foregår under telofase. Her når datterkromosomene spindelpolene, og nye kjernemembraner dannes rundt hvert sett av nye kromosomer. I cellemembranen dannes den kontraktile ringen som skal kløyeve cellen i to [10]. Cytokinese er som nevnt over prosessen der cellen deles i to nye datterceller ved hjelp av den kontraktile ringen. Den kontraktile ringen består av aktin og myosin, som ved hjelp av en bevegelse som ligner på muskelkontraksjon deler cellen i to.

De øvrige fasene av cellyklus kalles interfase, og det er her cellen dobler sitt DNA-innhold (S-fase) og vokser i størrelse. G₁- og G₂- fasene gir i tillegg cellene tid til å kontrollere at alle nødvendige prosesser er gjennomført før DNA replikeres og cellen deler seg [10].

1.1.5 Regulering av cellyklus

Cellers gang gjennom cellyklus må reguleres for å forsikre at de ulike fasene gjennomføres før cellen fortsetter inn i neste fase. For eksempel kan ikke DNA-innholdet replikeres dersom det er skadet, og mitose må ikke finne sted før alt DNA er replikert. Cellyklus reguleres av utallige komponenter som til sammen utgjør kontrollsystemet for cellyklus.

Hovedkomponentene i dette kontrollsystemet består av såkalte cyklinavhengige kinaser (cdk) [10,11]. Oppgaven til disse kinasene er å fosforylere målproteiner som blant annet er involvert i kromosomkondensering, nedbrytning av kjernemembranen og dannelsen av den mitotiske spindel. Disse kinasene må aktiveres for å kunne utøve sin funksjon. Kinasene kompleksbindes til forbindelser som kalles cykliner (Figur 1.5). De kalles cykliner fordi deres nivå i cellen varierer gjennom cellyklus. Det finnes flere ulike cyklinavhengige kinaser og cykliner i cellen, som alle utøver ulike funksjoner relatert til progresjon gjennom cellyklus. I tillegg til cyklinbinding kreves flere steg som involverer andre proteiner før komplekset er aktivt og overgangen til neste fase i cellyklus kan skje.

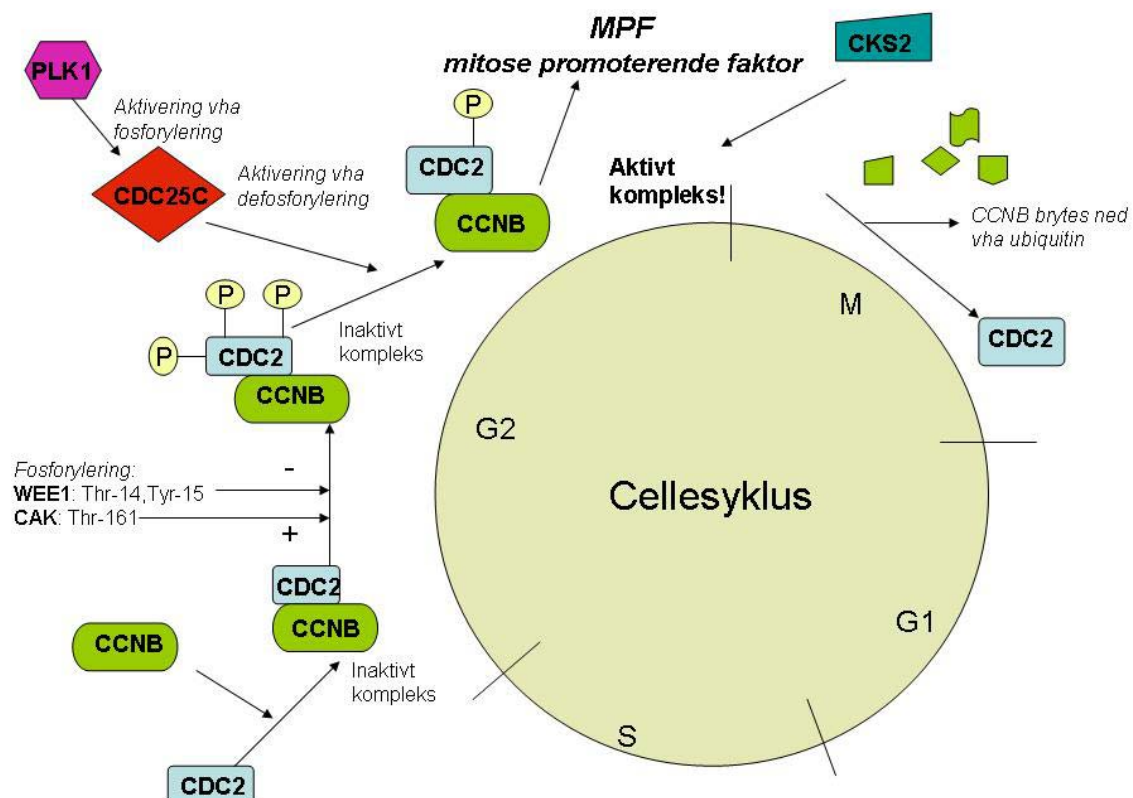


Figur 1.5: Reguleringen av cellyklus (forenklet). Hovedkomponentene i cellyklusreguleringen består av cyklinavhengige kinaser (cdk) og cykliner. Disse danner komplekser som er med på å drive cellen gjennom cellyklus. Det finnes mange ulike både cdk og cykliner.

I denne oppgaven har det blitt arbeidet spesielt med gener som koder for proteiner involvert i overgangen mellom G₂- og M-fasen i cellesyklus. Denne overgangen gjennomgås derfor i mer detalj.

1.1.6 Regulering av overgangen mellom G₂- og M-fase

I overgangen mellom G₂- og M-fase er den cyklinavhengige kinasen CDC2 og cyklinet CCNB (cyklin B) viktige komponenter (Figur 1.6) [10,11]. Komplekset mellom cyklinavhengig kinase og cyklin må videre aktiveres gjennom fosforylering. Cdkaktiverende kinase (CAK) fosforylerer CDC2 på Thr-161, hvilket gjør komplekset aktivt. Samtidig blir også CDC2 fosforylert av den hemmende kinasen WEE1 på Thr-14/Tyr15. Slik holdes komplekset inaktivt inntil cellen er klar for mitose. Da aktiveres komplekset ved defosforylering av de hemmende fosfatgruppene på Thr-14/Tyr15. Dette utføres av fosfatasen CDC25C, som igjen er avhengig av å bli aktivert av den pololignende kinasen PLK1 [10,12]. Det aktive komplekset kalles mitose promoterende faktor (MPF).



Figur 1.6: De antatt viktigste komponentene i reguleringen av overgangen mellom G₂- og M-fase i cellesyklus, og samspillet mellom disse som er med på å drive cellen inn i mitosen.

I tillegg til aktiverende og hemmende signaler reguleres inngangen til mitose av den intracellulære lokalisasjonen til CCNB/CDC2-komplekset [11]. Dette komplekset holdes igjen i cytoplasma ved hjelp av aktiv eksport ut fra kjernen inntil cellen er klar for mitose. Slik forhindres prematur mitose ved at komplekset som kreves for inngangen til denne fasen i cellyklus holdes utenfor kjernen.

Etter at cellen går inn i mitosen blir CCNB raskt brutt ned ved hjelp av ubiquitin [13]. Dette skjer ved at komplekset mellom CDC2 og CCNB fosforylerer et annet kompleks som deretter merker CCNB med en ubiquitinkjede. Denne kjeden merker cyklinet for nedbrytning i proteasomet. Nedbrytningen av CCNB er et signal til cellen som er med på å drive cellen ut av mitosen.

Studier har vist at CKS2-proteinet bindes til den aktive formen av CDC2 [8,14], og at proteinet dermed bindes etter at CDC2 har blitt kompleksbundet til CCNB. Proteinene er vist å være involvert i celleproliferasjon [14]. Genets/proteinets eksakte funksjon og tidspunkt for binding til CDC2/CCNB er imidlertid ukjent [15]. Det er vist at proteinet kan danne homodimere, og at det er foreslått at dette kan påvirke CKS2s evne til å binde til cyklin/cdk-komplekset [15]. I en studie er det vist at i meiose kreves ikke proteinet for inngang til mitose, men i overgangen mellom metafase og anafase [16]. Mer arbeid kreves for å kartlegge genets/proteinets funksjon i regulering av cellyklus.

1.2 Kreft og kreftutvikling

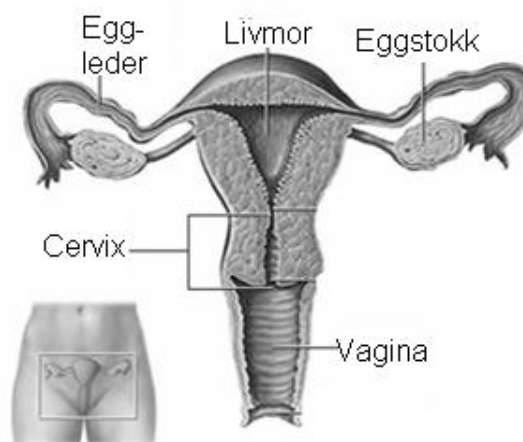
Kreft oppstår når mutasjoner fører til at cellen ikke lenger lystrer kontrollsystemet som styrer celleproliferasjon og overlevelse. En rekke tilfeldig mutasjoner fører til at cellen kan proliferere uten de normale bremsesystemene. Dattercellene arver disse mutasjonene, og gir opphav til en tumor som kan vokse uendelig [9].

De mutasjonene som fører til kreft skjer ofte i to hovedkategorier av gener, proliferasjonsgener og antiproliferasjonsgener. Proliferasjonsgener er gener som vanligvis fremmer celledeling. Mutasjoner i disse genene kan føre til hyperaktivitet eller overuttrykk av genene, slik at cellen deler seg ukontrollert. Dette mutante genet kalles derfor et onkogen, mens det opprinnelige genet kalles proto-onkogen. Antiproliferasjonsgener er gener som hindrer cellen i å proliferere, og en mutasjon i disse genene kan føre til at den bremsende

effekten disse har på proliferasjon oppheves. Disse genene kalles tumor-suppressorgener, og mutasjoner i disse genene kan også føre til at cellen deler seg urestriktivt. Eksempler på viktige tumor-suppressorgener er *TP53* og *RB1*. Genproduktet TP53 aktiveres blant annet av DNA-skade. Aktivert TP53 stimulerer transkripsjonen av et gen som koder for proteinet CDKN1A (p21). Dette proteinet hemmer cyklinavhengig kinase, noe som fører til at cellens progresjon gjennom celledyklus stanses. Proteinene RB1 holder normalt spesifikke genregulatoriske proteiner inaktive, inntil cellen får signaler om å proliferere. Da fosforyleres proteinet, og de genregulatoriske proteinene kan interagere med DNA og stimulere transkripsjon. Derfor er begge disse proteinene viktige bremseklosser i reguleringen av celledyklusprogresjon. Mutasjoner eller annen påvirkning av disse genene/proteinene kan derfor føre til at celler kan vokse og dele seg ukontrollert. Også andre defekter er involvert i utviklingen av kreft, og sykdomsutviklingen er mye mer komplisert enn det som her beskrives [9]. Celledykluslinjer benyttes ofte som modellsystemer for tumorer i kreftforskning, og er en viktig ressurs for studier av cellebiologiske prosesser i kreft [17]. En celledykluslinje består av celler hentet fra biopsier som har evne til å fortsette å proliferere i et kunstig miljø utenfor kroppen [18].

1.3 Livmorhalskreft

Livmorhalskreft er kreft som oppstår i epitellaget i kvinnens livmorhals (Figur 1.7). De to viktigste formene for denne krefttypen er plateepitelkarsinom og adenokarsinom [4]. Forskjellen mellom disse to typene er hvor i epitellaget kreftutviklingen starter.



Figur 1.7: Livmorens anatomi. Cervix er livmorhalsen, den nederste delen av livmoren. Figur modifisert fra [19].

1.3.1 Forekomst og statistikk

På verdensbasis ble det i 2002 estimert at det hvert år oppdages cirka 490000 nye tilfeller av livmorhalskreft, og cirka 270000 dør årlig av sykdommen [2]. I Norge ble det meldt om 270 nye tilfeller i 2004, og i 2003 døde 109 kvinner av sykdommen [20]. Spesielt i den 3. verden er livmorhalskreft et stadig voksende problem. Mens livmorhalskreft i den vestlige verden kun er den sjuende mest vanlige kreftformen blant kvinner, er livmorhalskreft på andreplass blant kvinner i utviklingsland [2]. Dette skyldes i hovedsak at det i de fleste vestlige land gjennomføres etablerte screeninger som fanger opp forstadier til kreftformen på et tidlig stadium [2,3]. Kreftformen er assosiert med et bredt aldersintervall, men forekommer hyppigst blant kvinner i 50- og 60-årsalderen [3].

1.3.2 HPV-virusets betydning for utviklingen av livmorhalskreft

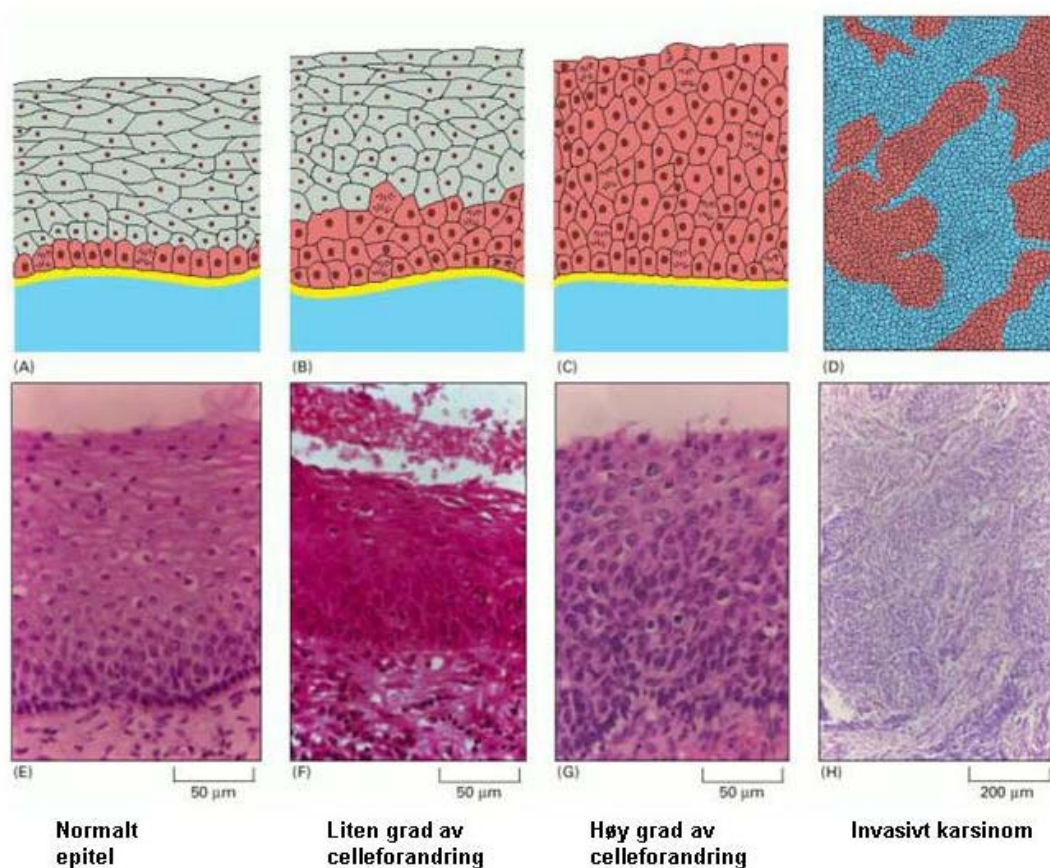
Både forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft selv er sterkt assosiert med humant papillomavirus (HPV). Dette viruset er svært vanlig, og finnes i ulike former. De forskjellige formene av HPV-viruset har ulik evne til å transformere livmorhalsepitelet. Høyrisikoformene av viruset, slik som 16, 18, 31, 33 og 35, observeres i flertallet av pasienter med livmorhalskreft. Viruset påvirker cellenes delingssyklus gjennom de virale proteinene E6 og E7. Disse proteinene kan binde og inaktivere proteinproduktene til tumor-suppressorgenene *TP53* og *RBI* [3,21-24]. HPV-infeksjon er derfor trolig en medvirkende årsak til at livmorhalskreft oppstår, men er sannsynligvis ikke tilstrekkelig [22]. Mye er fortsatt ukjent om hvordan krefttypen oppstår og utvikler seg.

1.3.3 Stadier av livmorhalskreft

Invasiv livmorhalskreft utvikles fra celleforandringer i cervix, og kan deles inn i fire stadier (Figur 1.8) [3]:

- Stadium 1: Tumoren er begrenset til livmoren.
- Stadium 2: Tumoren strekker seg utover livmoren, men involverer ikke bekkenets sidevegg eller nederste tredjedel av vaginaen.
- Stadium 3: Tumoren involverer nederste tredjedel av vagina eller bekkenets sidevegg.
- Stadium 4: Tumoren utviser omfattende lokal infiltrering eller har metastasert

Stadiene deles videre inn i undernivåer (ikke vist her).



Figur 1.8: Utviklingen av livmorhalskreft, fra celleforandringer til kreften er blitt invasiv. A-D viser skjematiske diagrammer, mens E-H viser histologiske snitt som illustrerer utviklingen. I et normalt epitellag er det kun cellene i det basale laget som deler seg (A, E). Ved liten grad av celleforandring finnes delende celler i den nederste tredjedelen av epitellaget (B, F), mens det ved høy grad av celleforandring finnes prolifererende celler i hele epitellaget (C, G). Invasivt karsinom infiltrerer bindevevet (D, H), og deles inn i 4 stadier av alvorlighetsgrad. Figur modifisert fra [10].

1.3.4 Diagnose og behandling av livmorhalskreft

Sikker diagnose av livmorhalskreft stilles etter biopsi fra vevet i livmorhalsen. Forstadier og mistanke om invasiv kreft oppdages som regel gjennom celleprøver fra cervix. Forstadier til kreft i cervix kan enten gå over av seg selv eller fjernes kirurgisk eller med laser. De avanserte stadiene av livmorhalskreft behandles ut fra alvorlighetsgrad. I de tidlige stadiene av sykdommen er kirurgisk behandling tilstrekkelig. Hvor omfattende inngrepet må være avhenger av infiltreringsgrad. Alvorlige former for livmorhalskreft (stadiene 3, 4 og deler av 2) behandles med ioniserende stråling. Som oftest behandles hele bekkenet, noe som kan føre til skade på normalt vev [3].

Fra 80 % (stadium 4) til 35 % (stadium 2) av pasienter med invasiv livmorhalskreft dør på grunn av vedvarende eller tilbakevennende kreft etter den initielle terapien. Livmorhalskreft med fjernmetastaser og tilbakefall av invasiv kreft behandles derfor med en kombinasjon av stråling og cellegift, hovedsakelig cisplatin [3]. Kjemoradioterapi har vist forbedring av respons i en del tilfeller, men effekten er ikke fullstendig klarlagt [25]. Det er derfor et sterkt behov for å kunne forbedre stråleterapi og eventuell kombinasjonsterapi, både for å forbedre effekten på tumoren, og for å i større grad kunne begrense skader fra stråling på friskt vev.

1.4 Ioniserende stråling

1.4.1 Røntgenstråling

Energi fra stråling som absorberes i biologisk materiale kan føre til eksitasjon eller ionisering av molekyler i vevet. Ved eksitasjon bringes et elektron i atomer eller molekyler over i et høyere energinivå, mens ved ionisasjon er energien høy nok til at elektroner frigjøres helt fra atomer eller molekyler. Slike frigjorte elektroner kan gi ionisering av vann og andre stoffer. Dette fører til dannelse av svært reaktive frie radikaler, som kan kollidere med nærliggende molekyler, forstyrre hydrostatiske bindinger og føre til videre ionisering og ødeleggelse av molekyler slik som DNA [26]. Ioniserende stråling deles videre inn i partikulær og elektromagnetisk stråling [18]. Røntgenstråling er ioniserende elektromagnetisk stråling. Denne typen stråling kan skade celler. Først og fremst påvirkes cellens kjerneinnhold. Ulike skader på genmaterialet kan oppstå, som enkelttråddbrudd, dobbelttråddbrudd og basemodifikasjoner [18,26,27].

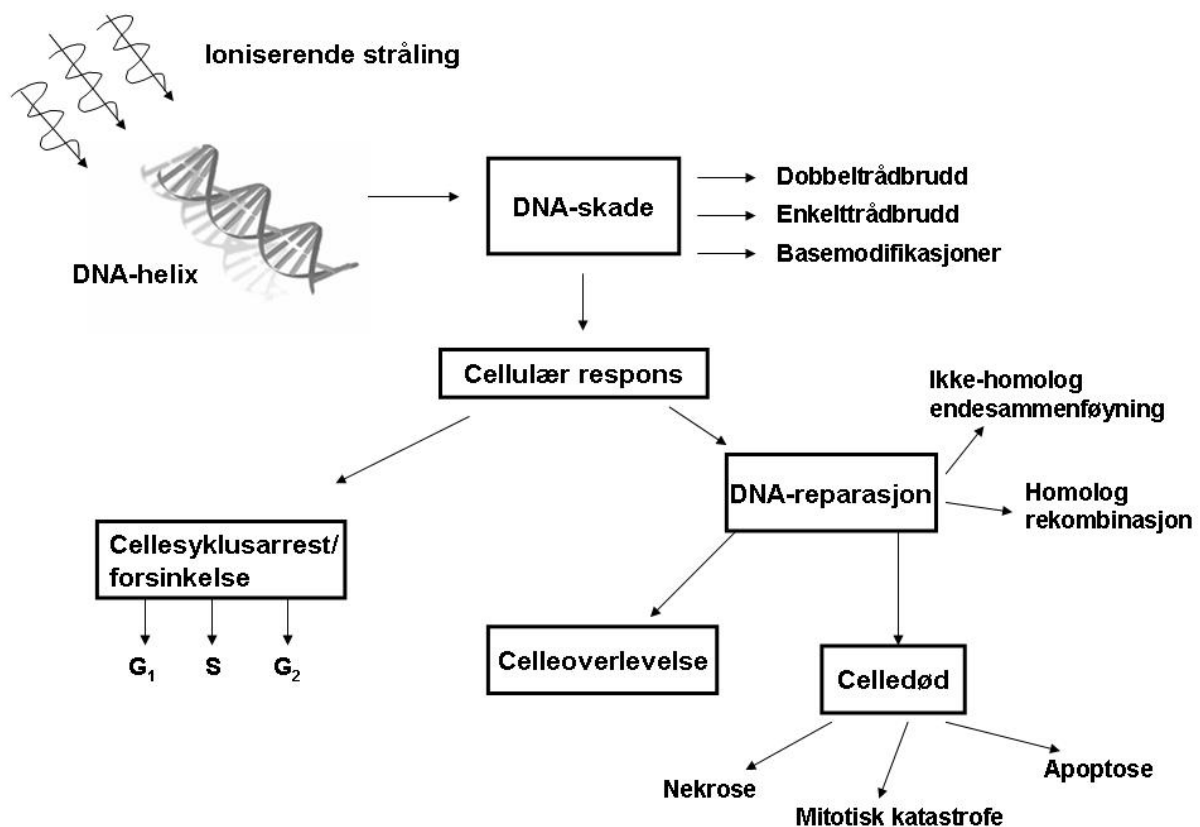
1.4.2 Strålerespons

Ioniserende stråling kan drepe både normale celler og kreftceller, hovedsakelig gjennom DNA-skade. Den mest alvorlige skaden som oppstår er dobbelttråddbrudd [18,28]. Slike skader aktiverer sjekkpunkter som kan føre til at S-fasen forlenges eller at cellen arresterer i G₁- eller G₂-fase for å reparere skaden. Disse sjekkpunktene kalles DNA-skadesjekkpunkter og kan påvirke de vanlige cellesyklusjekkpunktene [29].

DNA-skadesjekkpunkter kan defineres som et nettverk av proteiner som fungerer som henholdsvis sensorer, transdusere og effektorer. Sensorproteinene gjenkjenner DNA-skade og setter i gang aktiveringen av DNA-skadesjekkpunktene. Transdusere er vanligvis

proteinkinaser som viderefører og forsterker signalet fra sensorer. Blant annet fører den fosforylerende aktiviteten til disse kinasene til at effektorproteiner blir aktiverte, noe som medierer blant annet cellyklusarrest. Det er denne effektordelen av DNA-skadesjekkpunktene som interagerer med cellyklusmaskineriet [29].

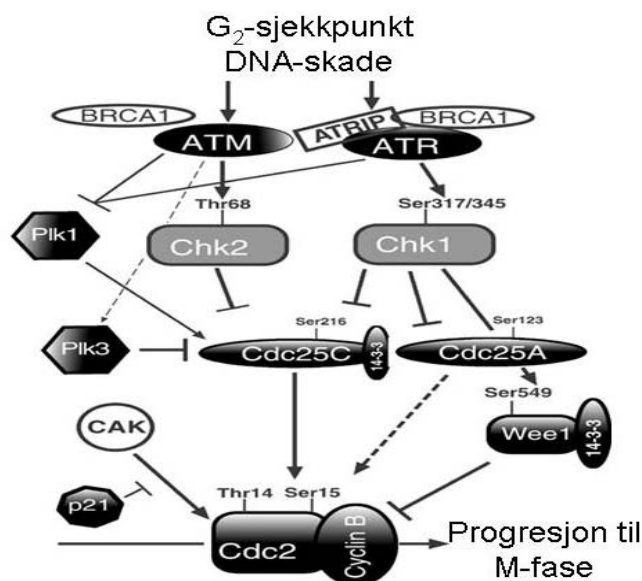
Forsinkelsene i cellyklus gir celler tid til å reparere DNA-skaden, og sørger også for at celler akkumuleres i faser av syklus der skaden mest effektivt kan repareres (Figur 1.9). Dobbelttrådbrudd repareres ved ikke-homolog endesammenføyning og homolog rekombinasjon [18,28,30]. Utfallet av reparasjonsprosessen avgjør om cellen overlever, og dersom cellen ikke greier å reparere skaden kan utfallet bli celledød.



Figur 1.9: Når celler bestråles med ioniserende stråling oppstår det DNA-skader. Dette kan føre til cellyklusarrest i G_1 og G_2 , forsinkelse av S -fasen og aktivering av DNA-reparasjonsmekanismer. Utfallet av DNA-reparasjonen fører enten til celleoverlevelse eller celledød.

Ioniserende stråling kan som nevnt blant annet føre til at cellyklus stopper opp ved overgangen mellom G_2 - og M -fasen. Denne G_2 -arresten skyldes aktivering av et DNA-

skadesjekkpunkt som setter i gang flere prosesser (Figur 1.10). DNA-skade fører til aktivering av transduserproteinene ATM og ATR, som kontrollerer den initielle fosforyleringen av proteiner som er involvert i DNA-skaderesponsen. Eksempelvis aktiveres proteinkinasene CHK1 og CHK2. Sentralt i reguleringen av DNA-skadesjekkpunktet i G₂ er hemmingen av fosfatasen CDC25C [26,29]. Denne fosfatasen spiller en viktig rolle i aktiveringen av CDC2/CCNB-komplekset ansvarlig for cellens overgang fra G₂-fase til mitose (se Figur 1.6). Aktivert ATM fører til aktivering av CHK2 som deretter fosforylerer og hemmer CDC25C. Parallelt aktiveres ATR, som fosforylerer CHK1 som også hemmer CDC25C. Videre fosforylerer aktivert CHK1 proteinet WEE1, noe som øker denne kinasens hemmende effekt på CDC2. ATM og ATR antas også å hemme PLK1 [29,31]. PLK1 fungerer normalt som en positiv regulator av CDC25C, og påvirkningen av denne regulatoren fører til at fosfatasen CDC25C ikke får fjernet de hemmende fosfatgruppene på CDC2. Også flere andre proteiner antas å være involvert i aktivering og vedlikeholdelse av G₂-arresten, som antydnet i Figur 1.10.



Figur 1.10: G₂-arrest som følge av DNA-skade involverer et omfattende nettverk av proteiner. Figur modifisert fra [29].

DNA-skade regulerer også CDC2-aktivitet gjennom påvirkning av CCNB proteinnivå og lokalisasjon i cellen. Blant annet holdes CCNB holdes igjen i cytoplasma, slik at CDC2/CCNB-komplekset som kreves for inngang til mitosen ikke kan utøve sin effekt [29,32,33]. Det er også gjort funn som tyder på at det etter DNA-skade aktiveres to ulike sjekkpunkter i G₂ [34]. Det ene sjekkpunktet aktiveres tidlig etter bestråling og påvirker celler

i G₂-fase ved bestråling. Sjekkpunktet er ATM-avhengig, forbigående og doseuavhengig, og fører til at cellene i G₂ stopper i cellesyklus og ikke kan fortsette inn i mitosen. Det andre sjekkpunktet aktiveres senere og påvirker celler som ved bestråling befant seg i tidligere faser i cellesyklus. Dette sjekkpunktet er ATM-uavhengig, doseavhengig og fører til at celler akkumuleres i G₂.

Det er vist at stålerespons kan variere mellom individer med samme tumortype, og til og med mellom celler fra samme vev [30]. Et gen involvert i G₂/M-overgangen i cellesyklus, *CKS2*, er forbundet med dårlig overlevelse [7]. Lite er kjent om hvordan dette genet og andre gener involvert i inngangen til mitose påvirkes av ioniserende stråling. Det er derfor viktig å kartlegge dette, slik at det kan finnes måter å manipulere og forbedre strålebehandlingen hos pasienter med dårlig respons.

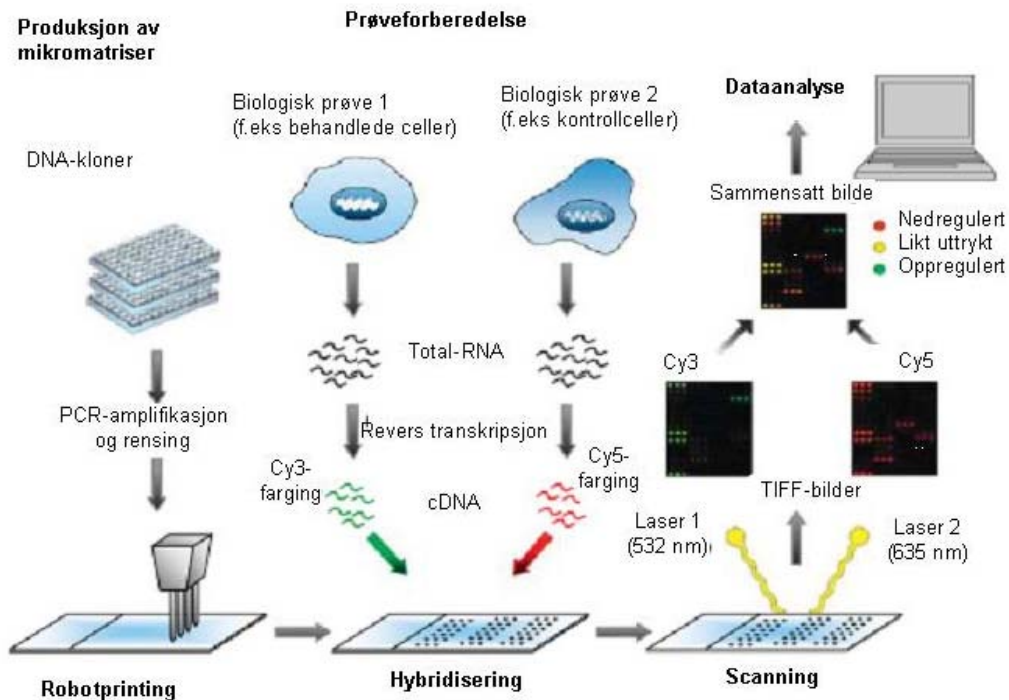
1.5 Mikromatriseteknikken

Mikromatriseteknikken baserer seg på binding av enkelttrådet DNA (prober) til små glassplater. Det kan trykkes titusenvs slike små DNA-prober på glassplatene [35-37]. En type enkelttrådet DNA som kan benyttes er komplementær DNA (cDNA). Med cDNA menes DNA som blir syntetisert med mRNA som templat ved hjelp av revers transkripsjon. Det kan undersøkes om det er relative forskjeller i uttrykk av gener i to prøver, for eksempel ubehandlede og behandlede celler. Dette gjøres ved at cDNA syntetiseres fra mRNA isolert fra de forskjellige prøvene. Dette gjøres fordi det er mengden mRNA i cellen som reflekterer i hvilken grad et gen er uttrykt. cDNA fra de to prøvene merkes deretter med hvert sitt fluorescerende fargestoff. Deretter føres begge prøvene over mikromatrisene og cDNA hybridiserer med probene på mikromatrisen. Etter hybridisering avbildes matrisen, og forholdet mellom signalene fra fargestoffene kan brukes til å beregne relativt genuttrykk for prøvene (figur 1.11). Teknikken er egnet til å identifisere forskjeller i genekspresjon blant et stort antall gener mellom to eller flere prøver [37].

Mikromatriseteknikken kan deles inn i 6 hovedtrinn [36]:

- 1) Produksjon av prober og trykking av mikromatriser
- 2) Merking av genmaterialet (cDNA syntetisert fra RNA) for analyse
- 3) Hybridisering
- 4) Scanning

- 5) Bildeanalyse
- 6) Dataprosessering og analyse



Figur 1.11: Trinnene i et mikromatriseeksperiment, fra produksjon av mikromatrisene via forberedelse av prøvene og til analyse av data. Figur modifisert fra [38].

1.5.1 Produksjon av prober og trykking av mikromatriser

Mikromatriser produseres ved at roboter trykker DNA-prober av for eksempel cDNA på små glassplater. cDNA amplifiseres ved hjelp av PCR-reaksjoner. Probene trykkes i spotter på mellom 80 og 150 μm i diameter. Mikromatriser kan inneholde opptil 80000 slike spotter. Gensekvensene som trykkes hentes fra internasjonale databaser [35-37].

1.5.2 Merking av genmateriale for analyse

Både total-RNA og mRNA kan brukes i mikromatriseanalyser, men det kreves god kvalitet for at eksperimentene skal bli vellykkede. Etter at RNA er isolert fra cellene syntetiseres det en cDNA-tråd fra mRNA ved hjelp av revers transkripsjon. Deretter brytes mRNA i prøven ned. Det syntetiserte cDNA farges med fluorescerende fargestoffer. Mest vanlig er Cy3 og Cy5, men andre kan også brukes [35-37].

1.5.3 Hybridisering

Med hybridisering menes at den enkle cDNA-tråden som har blitt produsert ved revers transkripsjon fra RNA i prøvene bindes til de komplementære probene på mikromatrisene. Selve hybridiseringen skjer på en såkalt hybridiseringsstasjon, der glassplatene med de påtrykte probene settes inn, deretter føres prøven over mikromatrisene ved hjelp av en bufferløsning [36].

1.5.4 Scanning

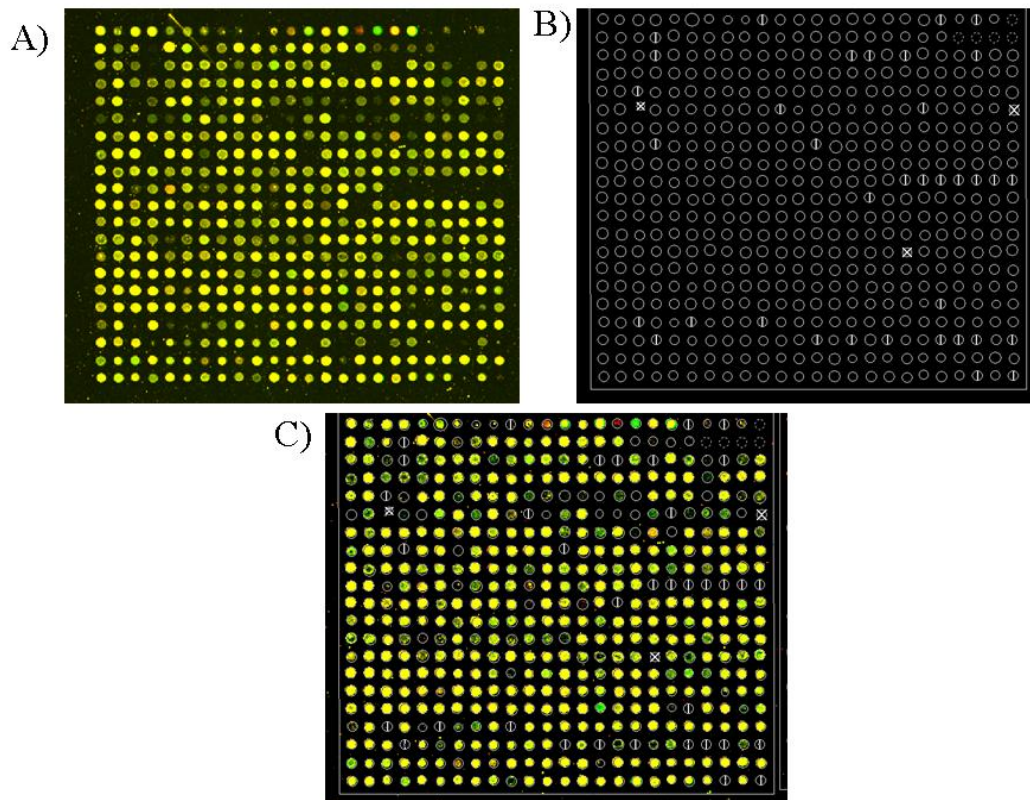
Mikromatrisene avbildes ved hjelp av en scanner som er laget spesielt for formålet. Fargestoffene som er bundet til cDNA eksiteres med laser (635 nm for Cy5 og 532 nm for Cy3). Fargestoffene sender deretter ut lys ved bestemte bølgelengder. Denne fluorescensintensiteten måles, og gir et bilde av hvor mye cDNA fra prøvene som har festet seg til proben [36,38]. Intensiteten fra hvert fargestoff detekteres i to ulike kanaler, kanal 1 og kanal 2, av en fotomultiplikator (PMT). Her forsterkes også signalet fra spottene. Scanneren har et deteksjonsområde for gjennomsnittlig intensitet på 1-65000 [39]. Innenfor området 200-65000 er forholdet mellom de målte intensitetene, og dermed det relative gennuttrykket, uavhengige av PMT-spenningen. Mikromatrisene kan ha deteksjonsverdier på PMT som ligger utenfor dette området, og dette må det korrigeres for. Ved intensiteter over 65000 kan signalet gå i metning. Spottene vil derfor få lavere intensitetsverdi enn det de faktisk har. Dette justeres ved at alle mikromatriser scannes to ganger. Mikromatrisene scannes en gang med 100 % av maksimal forsterkning på fotomultiplikatoren (100pmt), og en gang med 40 % av maksimal forsterkning (40pmt). Med 100pmt kan mange spotter gå i metning, men en unngår ikke-lineære effekter forbundet med lave intensiteter. Med 40pmt går ikke spottene i metning, men det kan oppstå problemer med ikke-linearitet ved lave intensiteter. 40pmt-scannet brukes til å korrigere for metning oppstått med 100pmt [39]. Resultatet presenteres i to TIFF-bilder, et grønt bilde for fargestoffet Cy3 og et rødt bilde for fargestoffet Cy5, og disse bildene viser hvor mye cDNA fra prøvene som har festet seg til probene på matrisen [36,38]. Disse to bildene brukes videre i analysen.

1.5.5 Bildeanalyse

Bildene bearbeides ved hjelp av dataprogram, for eksempel kan GenePix Pro benyttes [40]. Dette dataprogrammet beregner intensitetene i de ulike spottene på mikromatrisen. Ved å sette sammen de to TIFF-bildene som genereres ved avbildning av mikromatrisene kan programmet beregne forholdet mellom mengden cDNA fra de to prøvene som \log_2 -verdier. Dersom det

har festet seg mer cDNA fra den grønnmerkede prøven, vil spotten være grønn og omvendt. Dersom det er like mye cDNA i begge prøvene vil spotten være gul.

For å bestemme identiteten til hver spott leses en identifikasjonsfil inn i dataprogrammet. Denne filen inneholder et gitter som legges over spottene, og definerer størrelsen på spottene og hva de inneholder (Figur 1.12). Dette gitteret justeres til å passe spottene så nøyaktig som mulig både ved hjelp av GenePix Pro og manuell justering.



Figur 1.12: TIFF-bilde av en avbildet mikromatrise (A). Gitteret som brukes til identifisering og flagging (B). Bildet og gitteret kombineres for å finne identiteten til de enkelte spottene, og til å luke ut dårlige og tomme spotter(C).

Etter at dette gitteret er påsatt behandles spottene videre. Spotter som av ulike grunner ikke egner seg for analyse må fjernes. Dette gjøres både automatisk og manuelt. Programmet merker tomme spotter og spotter med for lave intensiteter med såkalte flagg. Der støy fra støy og lignende har påvirket spotter på mikromatrisen må disse manuelt flagges [40]. Når gitteret er justert og spottene kvalitetssjekket, lager programmet en resultatfil som prosesseres videre.

1.5.6 Datapreprosessering og analyse

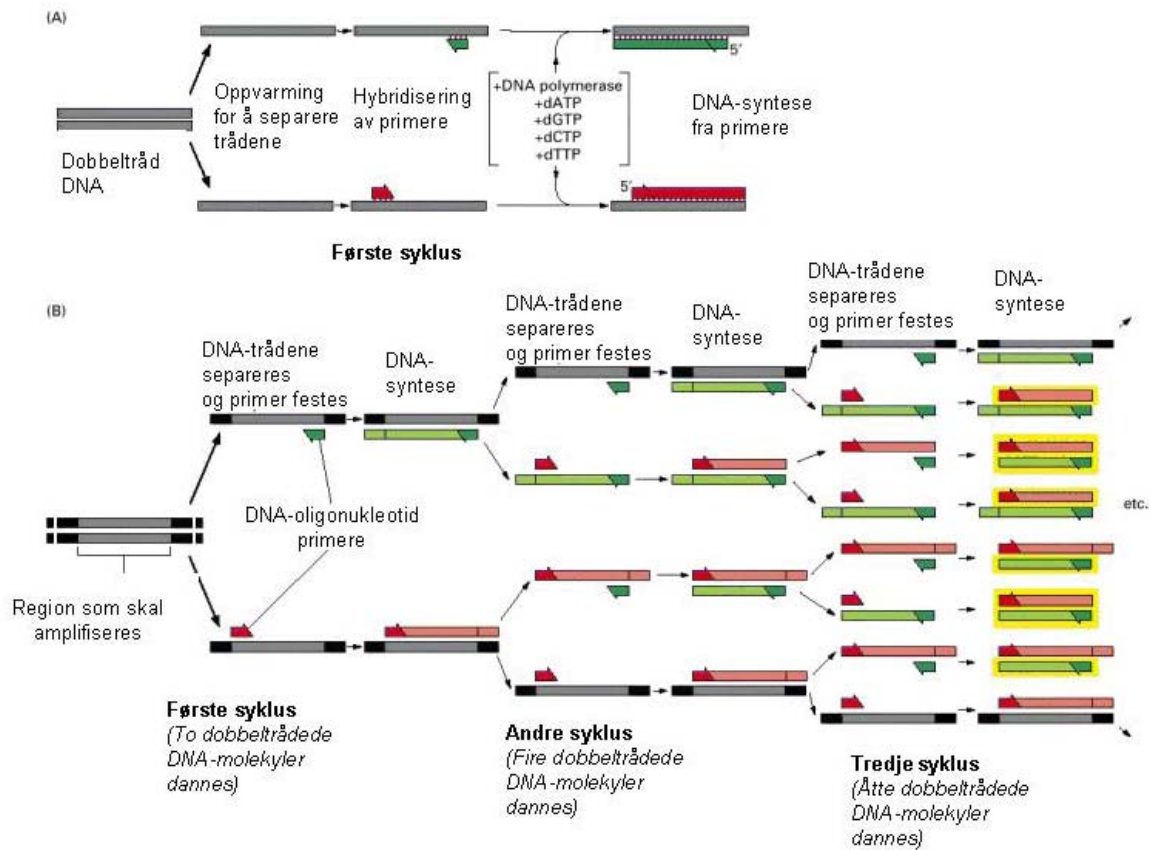
Resultatfilen etter bildeanalysen korrigeres for metning, filtreres og normaliseres. Korrigering av signaler som har gått i metning gjøres ved å benytte en tidligere utviklet algoritme [39]. Filtrering vil si at de spottene som ble automatisk og manuelt flagget i bildeanalysen fjernes. Normalisering gjøres for å kunne sammenligne intensiteter fra ulike mikromatriser ved å justere dataene for systematiske ikke-biologiske effekter som oppstår ved teknisk variasjon i eksperimentene [38]. For eksempel kan fargestoffene som brukes i mikromatrisereaksjoner bindes ulikt til forskjellige typer prøver, og ulike prøver kan bindes i forskjellig grad til probene på mikromatrisene. Med normalisering menes at det relative gennuttrykket (\log_2) justeres slik at det oppnås et glidende gjennomsnitt på 0, ved at verdiene justeres opp eller ned. Normaliseringen er intensitetsavhengig og det glidende gjennomsnittet beregnes med en algoritme kalt "loess" [41]. Normaliserte verdier representerer relativt gennuttrykk mellom de undersøkte prøvene.

1.6 Kvantitativ RT-PCR

1.6.1 Prinsipp for teknikken

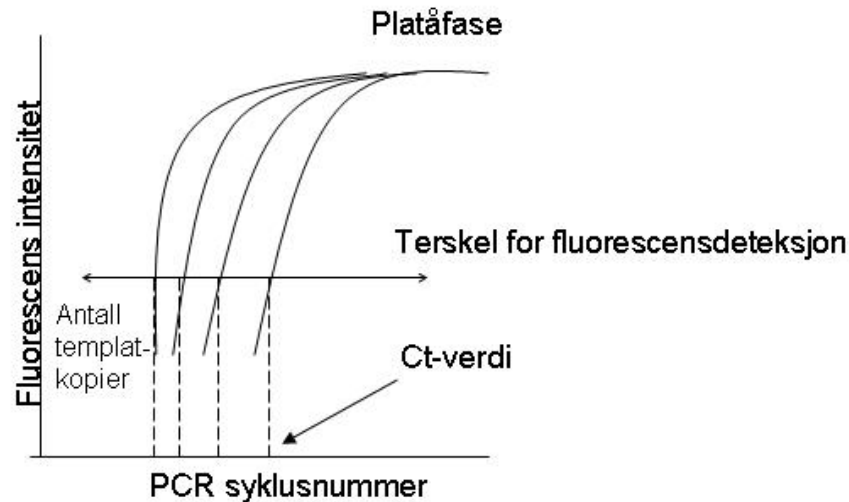
Kvantitativ RT-PCR står for kvantitativ real time-polymerase chain reaction. PCR er en reaksjon som amplifiserer DNA fra et templat [42]. Dette skjer i gjentatte sykluser der DNA henholdsvis smeltes, primere festes til sekvensen som skal amplifiseres og en polymerase forlenger DNA-tråden ved å sette inn nukleotider (Figur 1.13). En primer er et DNA-oligonukleotid som er komplementær til det templatet som skal amplifiseres. I første syklus dannes det to dobbeltrådede DNA-molekyler (Figur 1.13a). Deretter produseres det i andre syklus 4 dobbeltrådede DNA-molekyler, og videre 8 i neste (Figur 1.13b).

Dersom det er ønskelig å undersøke i hvilken grad et gen uttrykkes gjøres dette ved å isolere total-RNA eller mRNA fra cellen. Deretter transkriberes mRNA til cDNA ved hjelp av enzymet revers transkriptase. cDNA brukes videre i RT-PCR-reaksjonen [42]. Ved bruk av spesifikke primere som binder seg til bestemte gensekvenser, amplifiseres kun cDNA for de genene det velges å undersøke. Teknikken egner seg til å undersøke uttrykket av ett eller få utvalgte gener ved forskjellige tidspunkter.



Figur 1.13: Prinsippet for polymerase chain reaction. A viser detaljert beskrivelse av første syklus, mens B viser en skjematisk fremstilling av de tre første syklusene. Figur modifisert fra [10].

I real time-PCR måles antallet templatkopier fortløpende [42,43]. Dette gjøres ved at en fluorescerende reporter bindes til produktet (dobbeltrådet DNA), og rapporterer dannelsen av produktet ved å avgi fluorescens. I de første syklusene av reaksjonen er signalet svakt og kan ikke skilles fra bakgrunnen. Etter hvert som syklusene blir gjennomført øker mengden produkt eksponensielt inntil det nås metning. Metning nås når reaksjonen går tom for en reagens som er nødvendig for reaksjonen, for eksempel nukleotider eller primer. For å kvantifisere et produkt må en bestemme hvor mange amplifikasjonssykluser som kreves før en prøves responskurve når en bestemt terskelgrense. Dette er prøvens Ct-verdi (Figur 1.14). Ct-verdien brukes til å beregne den initielle mengden molekyler i prøven. Ved undersøkelse av genekspressjon brukes Ct-verdien til å beregne i hvilken grad et gen er uttrykt.



Figur 1.14: Forløpet for en RT-PCR-reaksjon. Ct-verdien avhenger av PCR syklusnummer og fluorescensintensitet. Fluorescensintensiteten øker når antallet templatkopier dannet i reaksjonen øker.

1.6.2 Beregning av relativt genuttrykk fra kvantitative RT-PCR målinger

Det finnes ulike metoder for å analysere data fra kvantitativ RT-PC, som absolutt kvantifisering ved hjelp av standardkurve og relativ kvantifisering [44]. I denne oppgaven ble $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden benyttet. Denne metoden baserer seg på relativ kvantifisering. Med relativ kvantifisering menes å relatere genuttrykket for prøvene til en referanseprøve. For å kunne sammenligne ulike Ct-verdier må dataene normaliseres. Dette kan gjøres ved å korrigere PCR-signalene ved hjelp av et endogent kontrollgen [42,44]. Den endogene kontrollen er et gen som uttrykkes stabilt i cellen, uavhengig av ytre påvirkning. I denne oppgaven ble genet B2M valgt som intern kontroll. Bruk av en endogen kontroll gjør det mulig å ta hensyn til ulike RNA-mengde og kvalitet i de ulike prøvene.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden gir et mål på relativt genuttrykk mellom cellene i prøven og en referanse, for eksempel ubehandlede celler. Metoden benytter seg av Ct-verdiene funnet ved hjelp av RT-PCR. $\Delta\Delta Ct$ beregnes ved ligning 1.1 [44]:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{B2M}})_{\text{prøve}} - (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{B2M}})_{\text{referanse}} \quad (1.1)$$

Deretter beregnes det relativt genuttrykk ut fra ligning 1.2 [44]:

$$\text{Relativt genuttrykk} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1.2)$$

2 Materialer og metoder

Det innledende arbeidet med å etablere cellelinjene for strålebiologiske studier ble utført i samarbeid med en annen hovedfagsstudent i farmasi. Her inngikk bestemmelse av vekstprofil, evne til kolonidannelse og strålefølsomhet.

Oppskrifter for løsninger laget ved avdelingen finnes i vedlegg 1. Kjemikalieliste med produsentinformasjon finnes i vedlegg 2.

2.1 Cellelinjer

I denne oppgaven ble to cervixcellelinjer benyttet; SiHa og HeLa. Cellelinjene ble skaffet fra forskningsgrupper ved Universitetet i Oslo og Rikshospitalet. Cellelinjene ble opprinnelig kjøpt fra ATCC (American Type Culture Collection) [45]. Cellelinjene ble i denne oppgaven etablert for strålebiologiske studier ved avdelingen. Dette innebar bestemmelse av vekstprofil, evne til kolonidannelse, strålefølsomhet og ulikheter i genuttrykk.

SiHa cellelinjen ble dannet fra plateepitelkarsinom, er TP53 og RB1 positiv og er infisert med HPV type 16 [46]. HeLa cellelinjen ble dannet fra epitelceller fra adenokarsinom [47], har lav ekspresjon av TP53 og normalt uttrykk av RB1 og er infisert med HPV type 18. Begge cellelinjene vokser som adherente celler. Plateepitelkarsinom og adenokarsinom er de to vanligste formene for cervixkarsinom [4].

2.2 Celledyrking og cellebehandling

2.2.1 Dyrking

Cellene ble dyrket i celledyrkingsflasker av størrelsen T₇₅ (75 cm²). Disse flaskene kunne romme 12-15 millioner SiHa-celler før cellene vokste konfluent, mens tallet var 5-7 millioner for HeLa-cellene. Cellene ble splittet eller fikk skiftet medium 2-3 ganger per uke. Cellene ble dyrket med 12-20 ml medium av typen Dulbeccos Modified Eagles Medium, med tilsats av 10 % føtalt bovint serum, 1 % L-glutamin og 1 % Penicillin/Streptomycin. Før all bruk ble mediet varmet opp til 37 °C på vannbad. Celleflaskene ble oppbevart i Steri-cycle CO₂ inkubator modell 371 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) ved 37°C, og med

CO₂-metning på 5 %. Alt celledyrking som krevde det, som splitting, medieskift og utsåing til forsøk, ble foretatt med aseptisk teknikk i Holten LaminAir LAF benk modell 1.2 (Allerød, Danmark).

2.2.2 Tillaging av cellesuspensjon

For å løsne cellene fra celledyrkingsflaskene ble mediet sugd av, cellene skylt med 2 ml Trypsin med EDTA, tilsatt nye 2 ml Trypsin med EDTA, etterfulgt av henstand enten ved romtemperatur eller ved 37 °C. Når cellene etter cirka 10 minutter hadde løsnet fra underlaget, ble det tilsatt 3-8 ml medium for å nøytralisere trypsinet, før suspensjonen ble overført til 15 ml rør og sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble deretter sugd av, pelleten resuspendert i passende mengde medium etter formål, og suspensjonen ble brukt videre til dyrking eller til forsøk.

2.2.3 Frysing

Etter mottak av cellelinjene ble det fryst ned en del celler som reserve i tilfelle det skulle oppstå infeksjoner i cellene som ble dyrket kontinuerlig. Celleflaskene ble trypsinert, nøytralisert med medium og cellesuspensjonen sentrifugert som tidligere beskrevet. Pelleten ble deretter resuspendert i fryseløsning bestående av 90 % føtalt bovint serum og 10 % DMSO. Cellene ble lagret i cryorør ved -80°C.

2.2.4 Tining

Nedfrosne celler ble tint ved at 5 ml oppvarmet medium ble tilsatt cryorørene, og pipettert opp og ned inntil cellesuspensjonen løsnet. Suspensjonen og mediet ble overført til 15 ml rør, og blandet godt. Røret ble deretter sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter. Mediet ble sugd av pelleten, og denne ble resuspendert i nytt medium, og overført til celledyrkingsflaske.

2.2.5 Celletelling ved hjelp av Coulter counter

Celleflaskene ble trypsinert, nøytralisert og sentrifugert som tidligere beskrevet. Deretter ble pelleten resuspendert i egnet mengde medium etter formål og antatt celleantall. 0,5 ml av denne cellesuspensjon ble blandet med 19,5 ml fysiologisk saltvann. Deler av denne blandingen ble ført inn i apparatet, og resultatet avlest. For beregning av antall celler per ml ble det avleste resultatet multiplisert med 20. Dette antallet ble brukt videre for å bestemme hvor mange ml som måtte benyttes for å oppnå et bestemt celleantall, eller hvor mange celler

en flaske inneholdt. Dette kunne beregnes ved å multiplisere antall celler per ml med antall ml pelleten ble resuspendert i.

2.2.6 Bestråling av celler

Til forsøkene der bestråling av cellene inngikk ble det benyttet 200 keV røntgenstråling. Røntgenapparatet som ble brukt var et Siemens apparat med en doserate på 387 rad/minutt (100 rad = 1 Gy) (Siemens, München, Tyskland), og det ble brukt kobberfilter på 0,5 mm. Ved bestråling ble cellene oppbevart i T₂₅-flasker (25 cm²), da det ved bruk av dette kobberfilteret oppnås et homogent strålefelt på størrelse med disse flaskene.

Strålingstid (t) for å oppnå ønsket dose fra dette apparatet ble beregnet ved bruk av følgende formel, ligning 2.1:

$$387 \text{ rad}/60 \text{ sekunder} = \text{ønsket rad}/t \text{ sekunder} \quad (2.1)$$

2.3 Vekstforsøk

Vekstforsøkene ble utført ved å så ut 75000 SiHa-celler og 50000 HeLa-celler i T₂₅ flasker, 3 paralleller per tidpunkt. Flaskene ble oppbevart i inkubator og cellesuspensjon ble laget og talt fra 3 flasker hver dag. Celleantallet ble bestemt ved hjelp av Coulter counter. Det ble startet med et noe høyere celleantall for HeLa enn for SiHa, da SiHa av erfaring vokste noe senere, og i tillegg tålte trange vekstforhold bedre. Det ble sådd ut flasker til 18 dager, for å forsikre at konfluent vekst ble oppnådd.

Doblingstid (T_d) ble beregnet ved bruk av ligning 2.2 [48]:

$$T_d = t * \ln 2 / (\ln(N_t/N_0)) \quad (2.2)$$

Her er t varigheten av den eksponentielle vekstfasen, N_t antall celler ved slutten av den eksponentielle fasen og N₀ antall celler ved starten av den eksponentielle fasen.

2.4 Kolonidannelse

For å bestemme cellelinjenes evne til kolonidannelse eller plating efficiency (PE), ble det utført koloniforsøk. Dette ble gjort ved å så ut henholdsvis 50, 100, 200, 400, 600, 800 og 1000 celler i T₂₅ flasker som ble inkubert i 17 dager. Det ble sådd ut 3 paralleller for hvert celleantall. Etter disse 17 dagene ble mediet helt av og cellene vasket med cirka 5 ml fysiologisk saltvann. Cellene ble fiksert med cirka 5 ml 70 % etanol, ved henstand noen minutter. Cellene ble farget ved å la cellene stå med cirka 5 ml tilsatt farge, komasinblått, i 30 minutter. Til slutt ble fargen helt av, cellene skylt med rennende springvann og flaskene tørket. Ved hjelp av mikroskop ble det estimert en størrelse for kolonier som inneholdt over 50 celler, og disse koloniene ble talt.

Plating efficiency ble beregnet ut fra ligning 2.3:

$$PE = \text{antall kolonier talt} / \text{antall celler sådd ut} \quad (2.3)$$

2.5 Strålefølsomhet

For å undersøke strålefølsomhet ble en dose-responskurve bestemt for hver av cellelinjene. For SiHa ble det sådd ut henholdsvis 300, 400, 600, 1000, 3000, 9000 og 30000 celler i T₂₅-flasker, 3 paralleller per stråledose. For HeLa ble det sådd ut henholdsvis 300, 400, 600, 1000, 5000, 30000 og 100000 celler i T₂₅-flasker, 3 paralleller per stråledose. Cellene ble deretter bestrålt med henholdsvis 0 (kontroll) 1, 2, 4, 6, 8 og 10 Gy. Etter bestråling ble flaskene oppbevart i inkubator i 16 dager, før cellene ble fiksert, farget og koloniene talt på samme måte som ved bestemmelse av kolonidannelse. Det ble beregnet en PE-verdi for kontrollcellene, som ble brukt til å beregne overlevelseshfraksjon ved de ulike dosene.

Overlevelseshfraksjonen ved de ulike stråledosene ble bestemt ut fra ligning 2.4:

$$\text{Overlevelseshfraksjon} = \text{antall kolonier talt} / (\text{antall celler sådd ut} * PE \text{ kontroll}) \quad (2.4)$$

2.6 Genekspresjonsstudier

2.6.1 RNA-isolering

RNA ble isolert fra cellene med TRIzol-reagens som detaljert beskrevet i vedlegg 3. Det ble anslått at 6-8 millioner celler burde benyttes for å oppnå ønsket mengde RNA. Da apparatet som ble benyttet under bestrålingen krever at cellene er oppbevart i T₂₅-flasker, ble cirka 1 million celler sådd ut i flere T₂₅-flasker. Alle flaskene ble bestrålt, og ved isolering av RNA ble TRIzol-reagenset tilsatt i en flaske, og deretter overført til neste i rekken og så videre. RNA ble videre brukt i mikromatriseeksperimenter og til kvantitativ RT-PCR.

Konsentrasjonen og kvaliteten til det isolerte RNA ble undersøkt ved hjelp av GeneQuant RNA/DNA-kalkulator (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) [49]. Denne RNA-kalkulatoren baserer seg på måling av optisk tetthet ved hjelp av UV-spektrofotometri.

2.6.2 Mikromatriseeksperimenter

Mikromatriser ble kjøpt fra kjernefasiliteten for mikromatriser ved Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF [50]. Mikromatrisene inneholdt 15000 cDNA kloner.

Mikromatriseeksperimentene ble gjennomført for å undersøke eventuelle forskjeller i genekspresjon mellom ubehandlede celler fra de to cellelinjene. Dette ble gjort ved å analysere mRNA fra den ene cellelinjen mot mRNA fra den andre. Metoden baserer seg på Fairplayprosedyren fra Stratagene, med noen modifikasjoner [51]. Før analysen ble cDNA syntetisert med isolert mRNA som templat som beskrevet i vedlegg 4. Deretter ble RNA nedbrutt ved basisk hydrolyse, og cDNA farget med de fluorescerende fargestoffene Cy3 og Cy5 som beskrevet i vedlegg 5. Det ble kjørt to paralleller av forsøket, og cDNA ble farget med Cy3 i det ene forsøket og Cy5 i det andre. Dette ble gjort for å unngå feil forbundet med ulik effektivitet i binding av de to fargestoffene til de ulike prøvene. For å bestemme en grense for hva som defineres som differensielt uttrykte gener, ble det i tillegg kjørt kontrollforsøk for begge cellelinjene. To prøver fra ubehandlede celler fra samme cellelinje, farget med hvert sitt fargestoff, ble analysert mot hverandre.

Følgende hybridiseringer ble utført:

Kontrollforsøk:

- SiHa ubehandlet (Cy5) mot SiHa ubehandlet (Cy3)
- HeLa ubehandlet (Cy5) mot HeLa ubehandlet (Cy3)

Sammenligning av genuttrykk:

- SiHa ubehandlet (Cy5) mot HeLa ubehandlet (Cy3)
- SiHa ubehandlet (Cy3) mot HeLa ubehandlet (Cy5)

Hybridiseringen ble utført på hybridiseringsstasjonen GeneTac (Genomic Solutions/Perkin Elmer, Boston, USA) over natt. Mikromatrisene ble festet i kammerene på hybridiseringsmaskinen, deretter ble det startet et program som utførte følgende:

- Mikromatrisene varmes først opp til 75°C, slik at gummiringene i hybridiseringskammeret festes godt, og prøven ikke lekker ut.
- Kammeret ble deretter kjølt ned til 65°C, og prøven ble tilsatt.
- Hybridiseringen ble utført over natt ved 65°C.

Etter å ha avsluttet programmet ble mikromatrisene vasket. Først ble de vasket i hybridiseringsmaskinen med vaskeprogram. Dette programmet vasket mikromatrisene med 3 påfølgende vaskeløsninger: Medium Stringency Wash Buffer, Hard Stringency Wash Buffer og Postwash Buffer. Til slutt ble mikromatrisene vasket manuelt. De ble tatt ut av kammerene og plassert i 50 ml rør med 0,05 x SSC-bufferløsning. Rørene ble vendt i to minutter, før vasken ble gjentatt. Deretter ble mikromatrisene overført til tomme 50 ml rør og sentrifugert ved 1000 rpm i to minutter. Dette ble gjort for å unngå at mikromatrisene skulle få tørkemerker. For nærmere informasjon om håndtering av hybridiseringsstasjonen henvises det til brukerhåndboken [52].

Ferdig hybridiserte mikromatriser ble scannet med Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA). Det ble utført to scann, ett med 100pmt og ett med 40pmt, som forklart i kapittel 1.5.4. Mikromatrisene ble festet i holdere som hører til scanneren, og plassert i scanneren. Dataprogrammet Agilent Scan Control ble brukt og følgende instillinger benyttet:

- Område: 67,2x21,6 mm
- Settings, default settings: Split and rotate Tif

Deretter ble scanningen startet ved å velge start. Cy3/Cy5 ble eksitert med laser, og det ble generert TIFF-bilder der intensiteten til spottene ga et bilde av hvor mye genmateriale som hadde festet seg, som forklart i kapittel 1.5.4. For nærmere informasjon om scanneren og programmet henvises det til brukermanualen [53]

2.6.3 Kvantitativ real time-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Det ble kjørt kvantitativ RT-PCR-reaksjoner for 6 ulike gener: *CCNB2*, *CCNB3*, *CDC2*, *PLK1*, *CKS2* og *B2M*. Sistnevnte gen (*B2M*) ble brukt som endogen kontroll, da genet antas å ha et stabilt nivå i cellen [44]. *CKS2* ble spesielt valgt ut på grunn av at det er vist at høyt uttrykk av genet er forbundet med dårlig prognose i eksperimenter med klinisk materiale [7]. De øvrige genene ble valgt ut fra at de er involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase i cellesyklus, og antas å være en del av samme signalvei som *CKS2*. *PLK1* ble i tillegg valgt fordi det finnes en del tidligere resultater for strålerespons for dette genet [54,55]. *CCNB*-genet finnes i 3 varianter; *CCNB1*, *CCNB2* og *CCNB3*. For *CCNB* ble *CCNB2* og *CCNB3* genene valgt, da tidligere arbeid ved avdelingen tyder på at det er disse formene for *CCNB* som er aktive i cervix (upubliserte resultater). Uttrykket av hvert av genene ble undersøkt etter behandling med ioniserende røntgenstråling (8Gy) og sammenlignet med tilsvarende genuttrykk i ubehandlet prøve. Prøvene ble undersøkt ved tidspunktene: 1/2, 4, 6, 8, 12, 24, 30 og 48 timer etter bestråling. Stråledosen, 8 Gy, ble valgt da det tidligere er observert at det oppnås en tydelig G₂-arrest ved denne dosen [56].

Til kvantitativ RT-PCR-forsøkene ble RNA isolert fra cellene som beskrevet i vedlegg 1. Fra mRNA ble cDNA syntetisert som beskrevet i vedlegg 6. cDNA ble i kvantitativ RT-PCR sådd ut i 96-brønners brett. Det ble tilsatt 10 ng cDNA per brønn, to parallelle brønner per prøve. Til hver brønn ble det også tilsatt 15 µl av en PCR-reaksjonsblanding. Denne blandingen inneholdt: 1,25 µl dH₂O, 12,50 µl PCR-blanding inkludert enzym og nukleotider (PCR-Master mix), og 1,25 µl Primerblanding. Det ble satt på optisk lokk og hele brettet ble vortexet. Brettet ble sentrifugert ved 1000 rpm i 5 sekunder for å bli kvitt bobler, og oppbevart mørkt på is frem til oppstart.

Selve RT-PCR reaksjonen ble gjennomført på 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Dataprogrammet 7500 fra samme produsent registrerte resultatene fortløpende, og følgende instillinger i 7500 ble benyttet:

- Assay: Absolute Quantification
- Container: 96-Well Clear
- Template: Blank document
- Fyll ut brønnoversikt
- Fyll ut benyttet prøvevolum

Selve RT-PCR-reaksjonen ble startet med en syklus ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 40 sykluser ved 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 1 minutt. Etter ferdig analyse ble Ct-verdiene fra 7500 eksportert, for senere å bli analysert videre. For nærmere informasjon om 7500-systemet henvises det til brukermanualen [57].

2.7 Analyse av eksperimenter

2.7.1 Analyse av mikromatrisedata

Mikromatriseresultatene ble bearbeidet i flere steg. Først ble dataprogrammet GenePix Pro fra Axon Instruments brukt til analyse av mikromatrisebildene. For nærmere informasjon om programmet henvises det til brukermanualen [58]. Resultatfilen fra GenePix Pro ble lastet over i den nettbaserte databasen BASE (BioArray Software Environment) [59]. BASE brukes til å bearbeide og kvalitetssjekke mikromatrisedata, og her ble filtrering, korrigering for metning og normalisering gjennomført. Nærmere beskrivelse av bildeanalyse og bearbeiding av mikromatrisedata er beskrevet i kapittel 1.5.5 og 1.5.6. Data generert fra BASE ble videre prosessert i Excel og SigmaPlot. Et MA-plott ble brukt til å bestemme hvilke gener som var differensielt uttrykte. I et slik plott vises det relative genuttrykket mellom prøvene (\log_2) (M) som funksjon av den gjennomsnittlige intensitet i spottene (\log_{10}) (A) [38].

2.7.2 Analyse av kvantitativ RT-PCR data

RT-PCR-dataene (Ct-verdier) fra programmet 7500 ble eksportert til Excel hvor de ble bearbeidet med $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden. Metoden er beskrevet i kapittel 1.6.2. Dataene ble plottet ved hjelp av SigmaPlot.

2.8 Statistisk analyse av resultater

2.8.1 Kolonidannelsesdata

Det ble ved hjelp av t-test og dataprogrammet Sigmastat beregnet om det var signifikante forskjeller i de to cellelinjenes evne til kolonidannelse.

2.8.2 Strålefølsomhetsdata

Det ble ved hjelp av t-test og dataprogrammet SigmaStat beregnet om det var signifikante forskjeller i strålefølsomhet mellom de to cellelinjene. P-verdier ble beregnet for alle stråledosene.

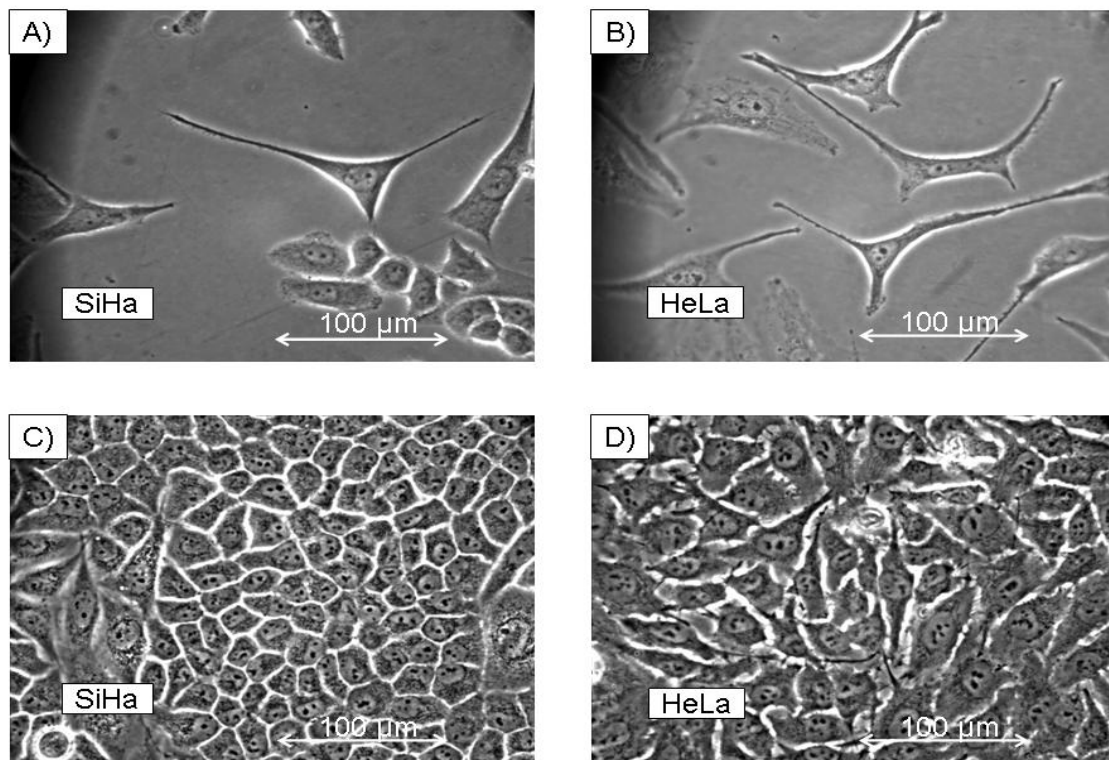
2.8.3 Kvantitativ RT-PCR-data

Utvalgte data fra de kvantitative RT-PCR-eksperimentene ble undersøkt med en-prøves t-test. Det ble i alle tilfellene testet om prøveverdiene var signifikant forskjellige fra referanseprøvens verdi. Dataene ble testet ved hjelp av dataprogrammet SPSS.

3 Resultater

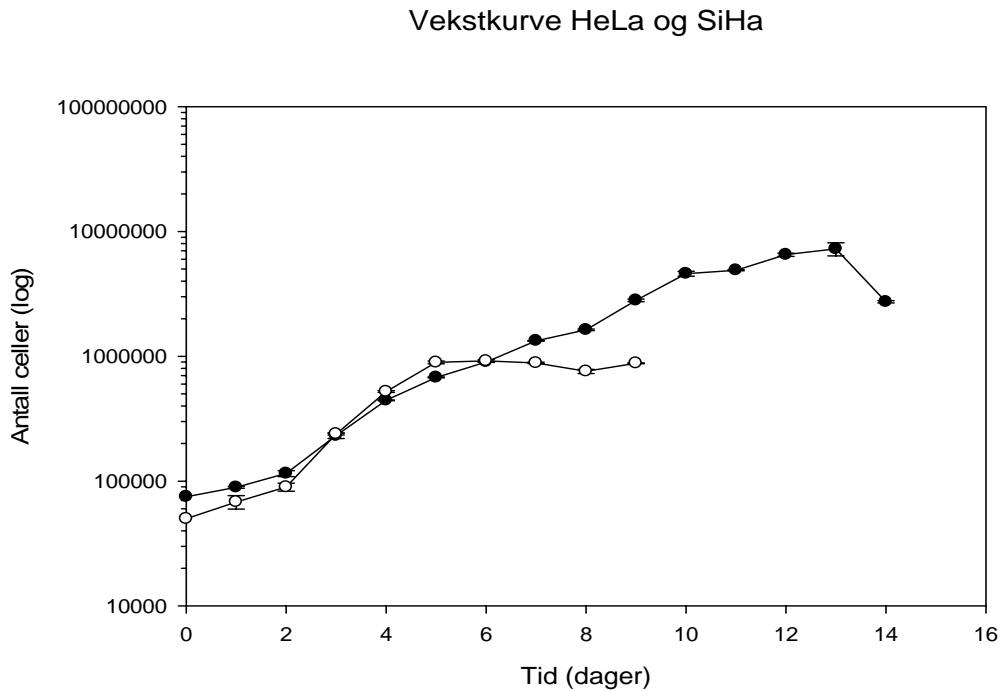
3.1 Vekstforsøk

Ved undersøkelse i mikroskop ble det sett at cellelinjene SiHa og HeLa hadde noe ulik vekstprofil. Når cellene ble sådd tynt ut, så cellene relativt like ut (Figur 3.1). Men når cellene vokste tett sammen så en tydelig forskjell. En kunne se at SiHa i større grad enn HeLa rundet seg opp når det ble trangt, slik at det ble plass til flere celler.



Figur 3.1: Over sees cellene når de var sådd tynt ut, SiHa (A) og HeLa (B). På bildene under illustreres forskjellene i vekstmønster mellom cellelinjene når cellene var sådd tett ut. SiHa (C) rundet seg opp og ga plass til flere celler, mens HeLa (D) forsøkte å vokse utstrakt. Dette førte til at HeLa cellene lett slapp taket når det ble trangt om plassen. Bilder tatt med lysmikroskop.

Vekstforsøket ble avsluttet når cellene begynte å dø, og celleveksten flatet ut. Resultatet er vist i Figur 3.2 der celleantall (log) er plottet mot tid etter utsåing.



Figur 3.2: Vekstkurver for cellelinjene SiHa og HeLa. Antall celler (log) som funksjon av tid etter utsåing. SiHa (●), HeLa (○). Hvert punkt på kurven representerer middelveiden av 3 paralleller med standardfeil. På x-aksen er dag 0 den dagen cellene ble sådd ut til forsøket. Det ble sådd ut henholdsvis 75000 SiHa-celler og 50000 HeLa-celler

Begge cellelinjene vokste relativt sakte de første dagene etter utsåing (lagfase), før de gikk inn i den eksponentielle vekstfasen. For HeLa begynte veksten å flate ut etter 5-6 dagers tid. Når HeLa-cellene begynte å bli konfluente slapp en del celler raskt taket, mens de cellene som fortsatt hang fast i plasten vokste videre. Derfor flatet HeLas vekstkurve ut mot slutten. SiHas vekstmønster var noe annerledes. Etter 12-13 dager stagnerte veksten noe, og på dag 14 hadde svært mange av cellene sluppet taket og dødd. Så i motsetning til HeLa løsnet SiHa på en mer "teppelignende" måte.

Doblingstiden ble bestemt i den bratteste delen av kurven (den eksponentielle vekstfasen), mellom 2 og 5 dager etter utsåing for HeLa og mellom 2 og 7 dager for SiHa. Ut fra disse resultatene ble det regnet ut en doblingstid på 0,9 dager for HeLa og 1,4 dager for SiHa. Dette viste at HeLa vokste raskere enn SiHa.

3.2 Kolonidannelse

Resultatene fra kolonidannelseforsøket er vist i tabellene 3.1 og 3.2.

Tabell 3.1: Resultater fra kolonidannelseforsøk for SiHa.

Antall celler sådd ut	Kolonier talt parallell 1	Kolonier talt parallell 2	Kolonier talt parallell 3	Gjennomsnitt av antall kolonier talt	Plating efficiency (PE) %	Standardfeil plating efficiency %
50	18	11	19	16,00	32,0	5,0
100	47	53	48	49,33	49,3	1,9
200	85	93	91	89,67	44,8	1,2
400	184	175	168	175,67	43,9	1,2
600	260	304	301	288,33	48,1	2,4
800	448	395	423	422,00	52,8	1,9
1000	459	471	466	465,33	46,5	0,4

Fra resultatene ble det bestemt en gjennomsnittlig plating efficiency for SiHa på $45,4 \pm 2,5$ %.

Tabell 3.2: Resultater fra kolonidannelseforsøk for HeLa.

Antall celler sådd ut	Kolonier talt parallell 1	Kolonier talt parallell 2	Kolonier talt parallell 3	Gjennomsnitt av antall kolonier talt	Plating efficiency (PE) %	Standardfeil plating efficiency %
50	36	32	24	30,67	61,3	7,1
100	64	57	68	63,00	63,0	3,2
200	134	110	120	121,33	60,7	3,5
400	160	182	179	173,67	43,4	1,7
600	224	224	227	225,00	37,5	0,2
800	294	296	311	300,33	37,5	0,7
1000	364	361	372	365,67	36,6	0,3

Dette ga en beregnet gjennomsnittlig plating efficiency for HeLa på $48,6 \pm 4,7$ %.

For SiHa så ikke celleantall ut til å spille noen rolle for evnen til kolonidannelse, verdiene for PE var relativt jevne for de ulike utsådde celleantallene. Hos HeLa sank PE når celleantallet økte. PE var ikke signifikant forskjellig mellom de to cellelinjene ($P=0,556$).

3.3 Strålerespons

Dose-responskurve er vist i Figur 3.3, der overlevelsesfraksjon er plottet mot stråledose.



Figur 3.3: Dose-responskurver for SiHa (●) og HeLa (○). Overlevelsesfraksjon er plottet som funksjon av stråledose. Hvert punkt representerer middelverdien av 3 paralleller med standardfeil.

HeLa var mer strålefølsom enn SiHa, overlevelsesfraksjonen var signifikant lavere ved alle stråledosene unntatt ved 2 Gy. Ut fra graf i figur 3.3 kan det sees at særlig ved de høyeste stråledosene (8 og 10 Gy) var forskjellene i overlevelsesfraksjon store. P-verdi for 2 Gy var på 0,067, mens for de øvrige stråledoser var $p < 0,002$. (Tabell 3.3).

Tabell 3.3: Overlevelsesfraksjoner SiHa og HeLa. Vist P-verdi for forskjellen mellom overlevelsesfraksjonene.

Stråledose:	Overlevelses-fraksjon SiHa	Overlevelses- fraksjon HeLa	P-verdi
1 Gy	0,89±0,01	0,73±0,02	0,001
2 Gy	0,63±0,03	0,55±0,01	0,067
4 Gy	0,39±0,01	0,22±0,01	<0,001
6 Gy	0,20±0,01	0,12±0,00	0,002
8 Gy	0,07±0,01	<0,01	<0,001
10 Gy	0,02±0,00	<0,01	0,001

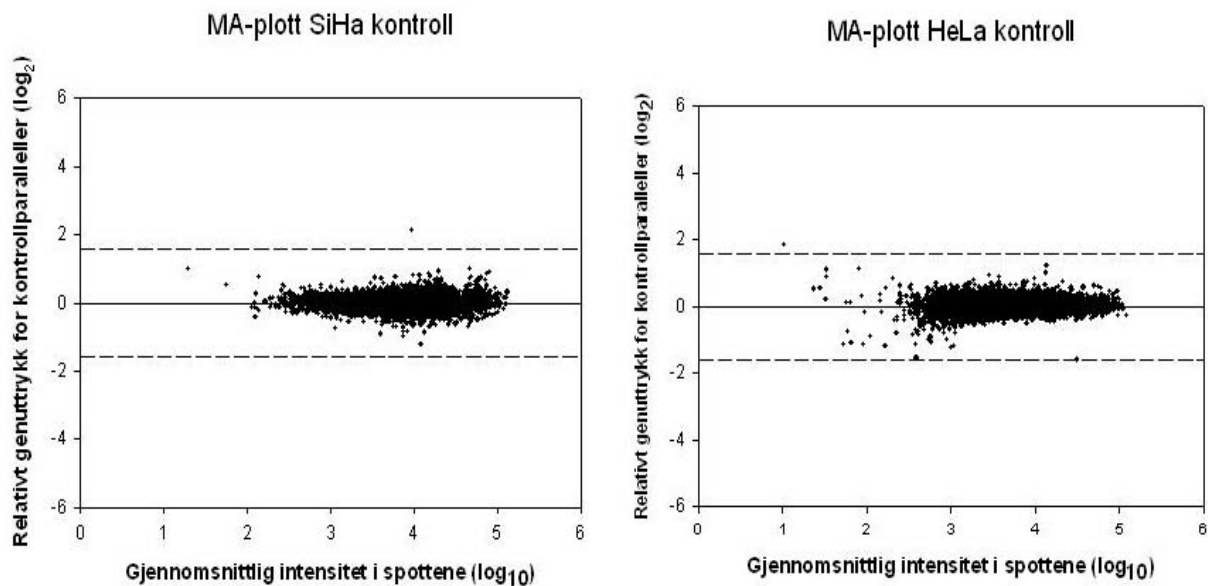
3.4 Genekspresjonsstudier

3.4.1 RNA-isolering

Mengden og kvaliteten på RNA-ble målt spektrofotometrisk som beskrevet i kapittel 2.6.1. Kravet til god kvalitet er et forhold mellom absorpsjon ved 260 nm og absorpsjonen ved 280 nm (A_{260}/A_{280}) på 1,8-2,0 [38,60]. Oversikt over målinger av mengde og kvalitet på RNA er angitt i vedlegg 7. Alle prøvene benyttet i denne oppgaven hadde A_{260}/A_{280} på over 1,8, og alle målinger lå innenfor 1,8-2,2.

3.4.2 Mikromatriseforsøk

For å bestemme en grense for når et gen er differensielt uttrykt i den ene cellelinjen i forhold til den andre, ble det gjort forsøk der to RNA-prøver fra ubehandlede celler fra samme cellelinje ble analysert mot hverandre. cDNA syntetisert med RNA som templat ble hybridisert til mikromatrisene. Resultatet er vist som MA-plott for SiHa og HeLa (Figur 3.4).

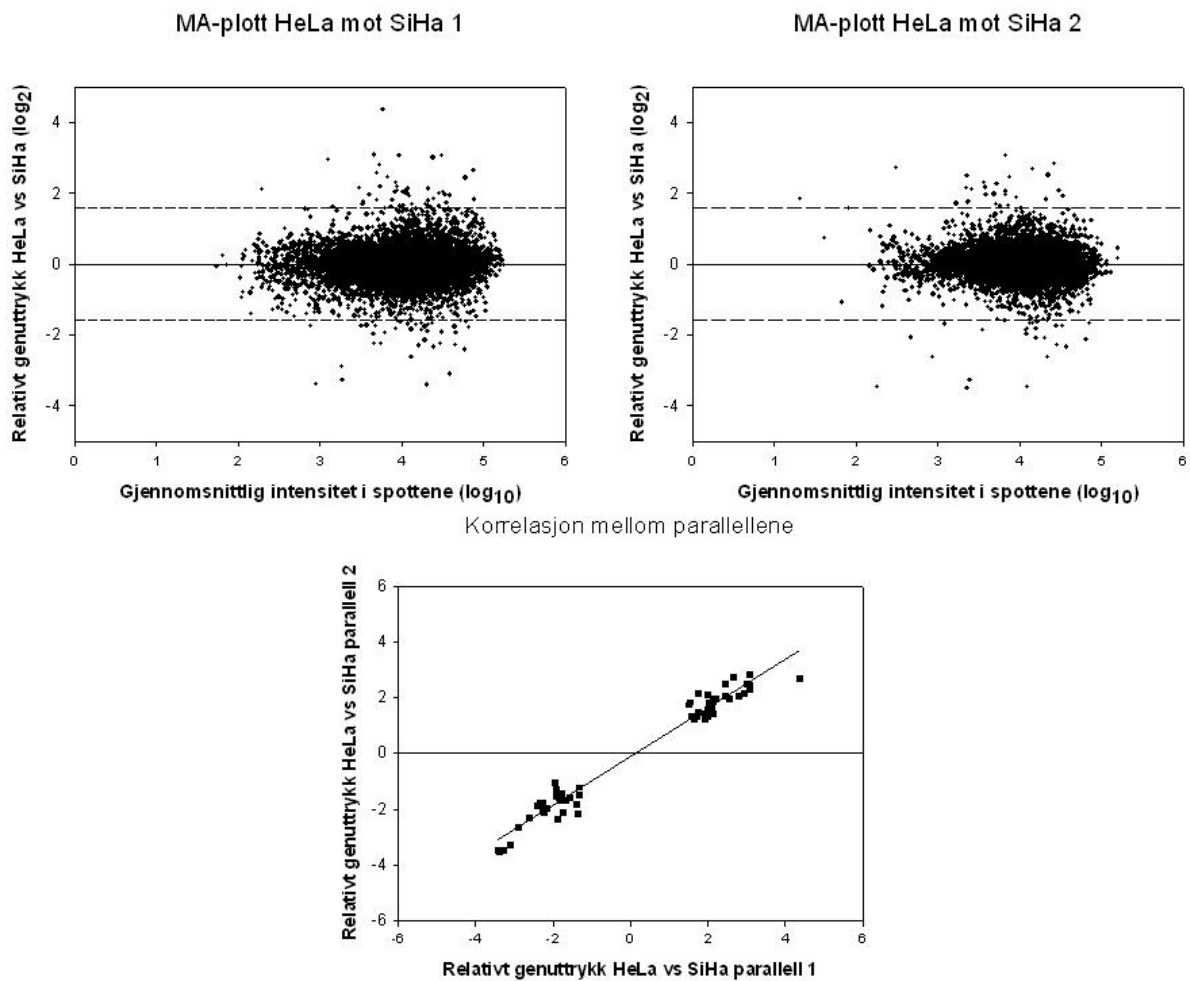


Figur 3.4: MA-plott av relativt genuttrykk mellom to paralleller av kontrollceller (\log_2) som funksjon av gjennomsnittlig intensitet i spottene (\log_{10}) for kontrollmikromatriser for SiHa (A) og HeLa (B). De stiplede linjene angir en øvre og nedre grense på en faktor 3.

Det ble valgt en grense for mer eller mindre uttrykte gener på en faktor 3, da svært få punkter faller utenfor disse grensene. Med \log_2 -skala på aksen gir dette et relativt genuttrykk på 1,6. Denne grensen ble brukt til å undersøke relativt genuttrykk for HeLa sammenlignet med SiHa.

For å undersøke slike eventuelle forskjeller i genuttrykk ble RNA fra ubehandlede HeLa-celler analysert mot tilsvarende RNA fra SiHa. cDNA syntetisert med RNA som templat ble hybridisert til mikromatrisene. Ved bearbeiding av dataene i BASE ble intensitetene fra HeLa registrert i kanal 1, mens intensitetene fra SiHa i kanal 2. Derfor vil gener som har verdier høyere enn 1,6 på \log_2 -skala være mer uttrykt i HeLa, og gener som har verdier på \log_2 -skala lavere enn -1,6 mer uttrykt i SiHa. Det ble kjørt to paralleller av forsøket som beskrevet i kapittel 2.6.2.

Resultatet er vist under i form av et MA-plott for hver av de to parallellene (Figur 3.5). I tillegg vises korrelasjonsplot for genene som ble funnet differensielt uttrykt mellom cellelinjene fra de to parallellene.



Figur 3.5: Relativt genuttrykk (\log_2) for parallell 1 HeLa mot SiHa (A) plottet mot gjennomsnittlig intensitet i spottene (\log_{10}) (B) viser tilsvarende data for parallell 2 HeLa mot SiHa. De stiplede linjene angir en øvre og nedre grense på en faktor 3, som ble brukt til å bestemme differensielt uttrykte gener. I (C) vises korrelasjonen mellom det relative genuttrykket for de genene som ble funnet differensielt uttrykt mellom cellelinjene fra de to parallellene.

Korrelasjonen mellom de to parallellene var meget bra, regresjonslinjen fikk beregnet en stigningskoeffisient på 0,97. Kun gener som hadde gjennomsnitt på henholdsvis over 1,6 eller under -1,6 på \log_2 -skala ble definert som differensielt uttrykte. Alle gener med relativt genuttrykk som indikerte at genet var mer uttrykt i SiHa i den ene parallellen hadde også et slik genuttrykk i den andre parallellen. Det samme gjaldt for HeLa. I et par tilfeller ble det kun funnet verdi for genene i den ene parallellen, fordi dataene for dette genet var ekskludert i

den andre parallellen. Den ene verdien ble brukt videre på lik linje som gjennomsnittet av to paralleller for de øvrige genene.

Det ble funnet 58 gener som var ulikt uttrykt i de to cellelinjene. Disse genene vises i sin helhet i vedlegg 8, der beskrivelse, kromosomlokalisasjon og relativt genuttrykk (\log_2) også oppgis. Det ble funnet en del differensielt uttrykte gener med interessant biologisk funksjon (Tabell 3.4).

Tabell 3.4: Differensielt uttrykte gener med interessant biologisk funksjon. Genfunksjon hentet fra Source [61].

Gensymbol:	Genfunksjon:	Mest uttrykt i:
<i>TNFSF7</i>	Apoptose	SiHa
<i>MYC</i>	Cellesyklusarrest	HeLa
<i>RASSF1</i>	Rasprotein signaltransduksjon	HeLa
<i>SI00P</i>	Kalsiumbindende protein, i tumorutviklingen av livmorhals-adenokarsinom.	HeLa
<i>INHBB</i>	Cellevekst og differensiering	HeLa
<i>KLF6</i>	Cellevekst og differensiering	HeLa

Ved undersøkelse av de differensielt uttrykte genene ble det også funnet kromosomregioner der flere gener var differensielt uttrykte. To eksempler er vist i Tabell 3.5.

Tabell 3.5: Differensielt uttrykte gener på samme kromosomregion. Genbeskrivelse er hentet fra Source [61].

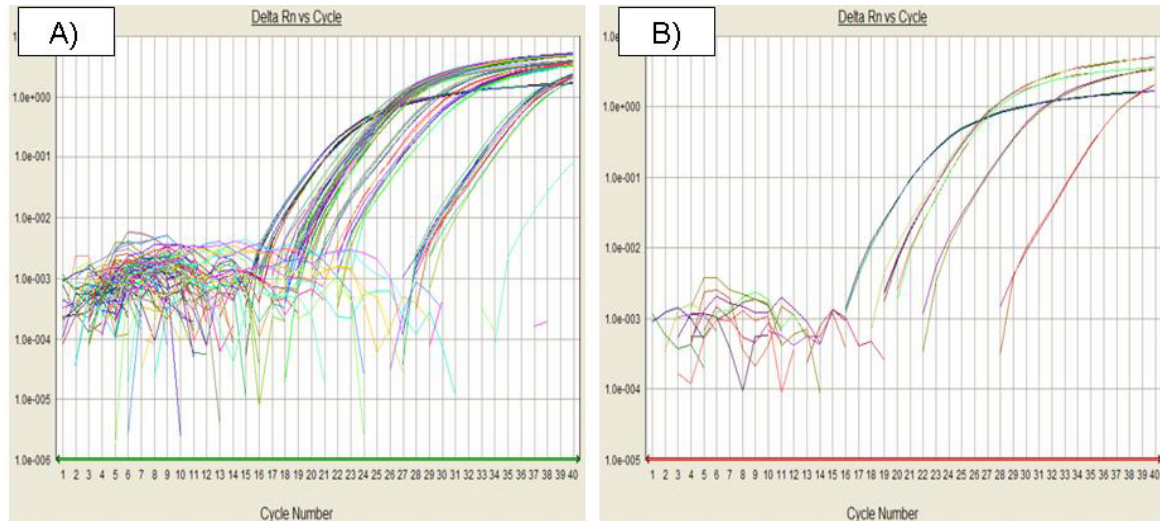
Gener mer uttrykt i SiHa enn HeLa			
Gensymbol	Cytoband	Beskrivelse	Relativt genuttrykk (\log_2)
<i>NQO1</i>	16q22.1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	-1,68
<i>NUTF2</i>	16q22.1	Nuclear transport factor 2	-1,67
<i>CGI-128</i>	16q22.1-q22.3	CGI-128 protein	-1,78
Gener mer uttrykt i HeLa enn SiHa			
Gensymbol	Cytoband	Beskrivelse	Relativt genuttrykk (\log_2)
<i>UCP3</i>	11q13	Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	1,85
<i>ALDH3B2</i>	11q13	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	2,26
<i>FOLR2</i>	11q13.3-q13.5	Folate receptor 2 (fetal)	2,26
<i>FOLR1</i>	11q13.3-q14.1	Folate receptor 1 (adult)	2,86
<i>PRSS23</i>	11q14.1	Protease, serine, 23	1,74

På kromosomregion 16q og 17q for SiHa og på 11q for HeLa, ble det funnet flere gener som var differensielt høyere uttrykt i forhold til den andre cellelinjen. Slike funn kan tyde på forskjell i gens kopitall mellom cellelinjene. Ulikt kopitall kan skyldes amplifikasjoner eller delesjoner i den ene cellelinjen.

3.4.3 Kvantitativ RT-PCR

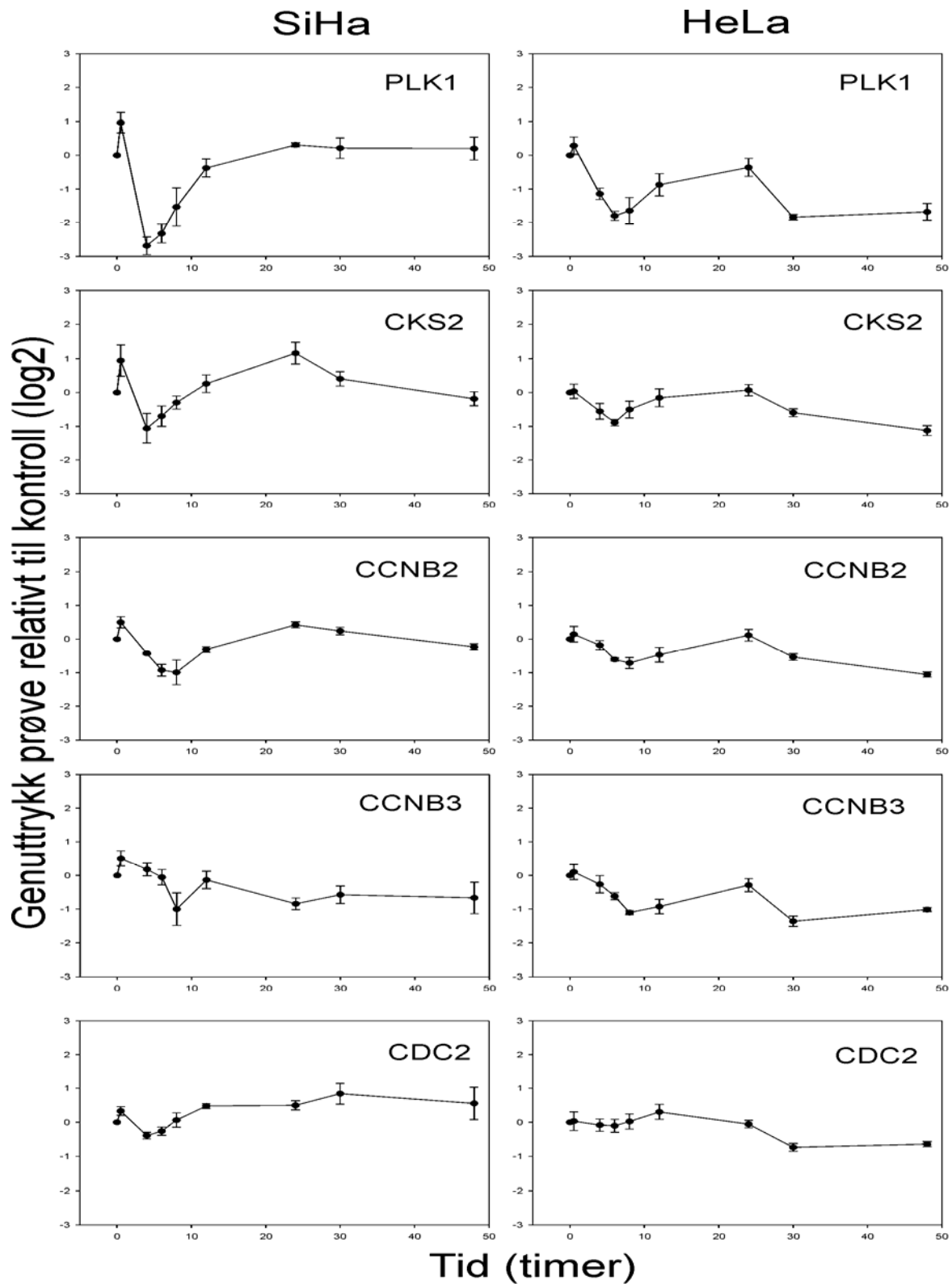
Ved undersøkelse av relativt genuttrykk med kvantitativ RT-PCR ble prøvene sådd ut i 96-brønners brett. Et typisk amplifikasjonsplott fra ett av de undersøkte brettene i denne oppgaven er gjengitt i Figur 3.6a. Ved utsåing i 96-brønners brettene, ble det for hvert brett sådd ut to brønner for hvert tidspunkt undersøkt for alle genene. Samsvaret mellom disse parallellene var vanligvis godt, som illustrert i Figur 3.6b. Dataprogrammet 7500 brukt i

analysen registrerte i tillegg til Ct-verdiene avvikene mellom de parallelt utsådde brønnene. Dette kan brukes til å kvalitetskontrollere dataene, da høye avvik vil varsle om usikkerhet i målingene. Avvikene mellom de utsådde parallellene er presentert i sin helhet i vedlegg 9.



Figur 3.6: Typisk amplifikasjonsplott for et utvalgt brett undersøkt ved hjelp av kvantitativ RT-PCR. Her ble uttrykket av ulike gener undersøkt ved bestemte tidspunkter etter bestråling. Et slik plott ble brukt til å bestemme Ct-verdiene for de ulike prøvene. Amplifikasjonsplott for et helt brett (A). Tilsvarende plott for de undersøkte genene ved et bestemt tidspunkt (B). Linjene fra de to parallelle brønnene ligger så godt som oppå hverandre, noe som tyder på at avviket mellom dem var svært lite. To av linjene representerer genet B2M, som ble brukt til å korrigere de andre genenes verdier for eventuelle variasjoner i utsådd RNA, og til å beregne relativt genuttrykk.

Resultatene for genene undersøkt ved hjelp av kvantitativ RT-PCR er vist i Figur 3.7, der tidsutviklingen for uttrykket av de ulike genene er vist som en funksjon av tiden etter bestråling. Beregninger av relativt genuttrykk gir i utgangspunktet verdier for det relative genuttrykket fra 0 og oppover, der verdien for kontrollen automatisk vil bli beregnet til 1. Dette gjør at gener som er henholdsvis opp- og nedregulert behandles ulikt. Et gen som er oppregulert med en faktor 2 vil få et relativt genuttrykk på 2, mens gener som nedreguleres med samme faktor vil få relativt genuttrykk på -0,5 [41]. For å bedre vise dynamikken mellom opp- og nedregulering ble derfor absoluttverdiene \log_2 -transformert. Slik vil kontrollens verdi bli beregnet til 0, og opp- og nedreguleringer med samme faktor vil fordeles symmetrisk rundt denne verdien.

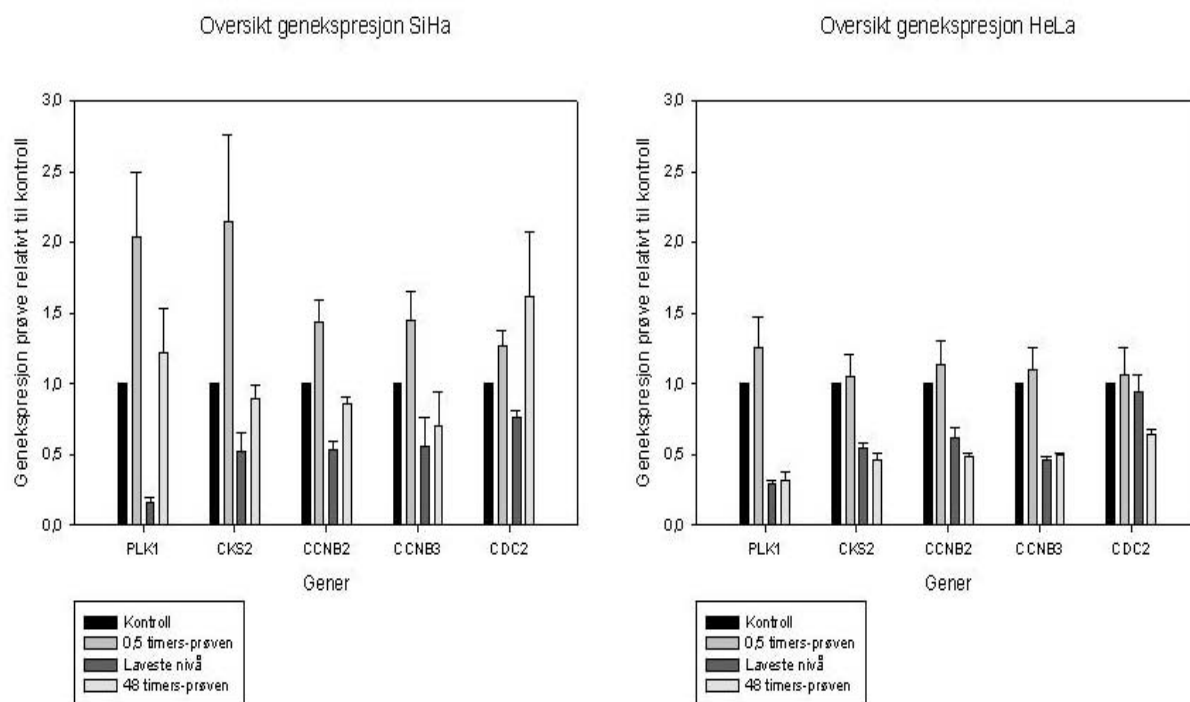


Figur 3.7: Relativ endring i genuttrykk (log₂) etter bestråling for fem utvalgte gener (PLK1, CKS2, CCNB2, CCNB3 og CDC2) i celledinjene SiHa (venstre kolonne) og HeLa (høyre kolonne), plottet mot tid etter bestråling. Hvert punkt representerer gjennomsnittet av 3 paralleller med standardfeil.

For SiHa var tendensen i det relative genuttrykket lik for alle de fem utvalgte genene. En halv time etter bestråling økte genuttrykket noe, før det falt i varierende grad. Genuttrykket nådde laveste nivå 4 timer etter bestråling for *PLK1*, *CKS2* og *CDC2*, og 8 timer etter bestråling for *CCNB2* og *CCNB3*. Etter laveste nivå økte det relative transkriptnivået igjen. Ved tidspunktet 48 timer etter bestråling så transkriptnivået ut til å ha kommet tilbake til nivået for den ubestrålte referansen for alle genene.

Det relative genuttrykket for de utvalgte genene fulgte stort sett samme tendens i HeLa som i SiHa. Tendensen til oppgang en halv time etter bestråling var mindre markant. Deretter falt genuttrykket, og nådde bunnen 6 timer etter bestråling for *PLK1*, *CKS2* og *CDC2*, og 8 timer etter bestråling for *CCNB2* og *CCNB3*. Etter laveste nivå økte genuttrykket igjen. Men i motsetning til hos SiHa falt deretter transkriptnivået på nytt, slik at etter 48 timer var ikke transkriptnivået likt som for den ubestrålte referansen. Denne tendensen var lik for alle de undersøkte genene.

For å undersøke om genuttrykket endret seg signifikant etter bestråling ble det utført t-test for verdiene for det laveste målte nivået. Tidspunktet de laveste nivåene ble målt, varierte for de ulike genene mellom 4, 6 og 8 timer etter bestråling. For å undersøke om genuttrykket hadde gått tilbake til transkripsjonsnivået for den ubestrålte referansen, ble 48 timers-prøvene testet. Det ble også testet om oppgangen en halv time etter bestråling var signifikant. Figur 3.8 viser det relative genuttrykket med standardfeil ved disse nevnte tidspunktene for SiHa og HeLa (absoluttverdier). Tabell 3.6 viser beregnede p-verdier for forskjellen mellom genuttrykket for cellene etter bestråling og uttrykket for ubehandlede celler.



Figur 3.8: Genuttrykket (absoluttverdier) til henholdsvis kontroll, halvtimes-prøvene, laveste nivå og 48 timers-prøvene. Hver stolpe representerer gjennomsnitt for 3 paralleller med standardfeil.

Tabell 3.6: P-verdier for forskjellen mellom verdier fra bestrålte celler og ubestrålte celler.

Tidspunkter:	0,5 timer		Laveste nivå		48 timer	
Gener:	SiHa	HeLa	SiHa	HeLa	SiHa	HeLa
<i>PLK1</i>	0,149	0,351	0,001*	0,002*	0,551	0,007*
<i>CKS2</i>	0,265	0,798	0,088	0,006*	0,471	0,008*
<i>CCNB2</i>	0,115	0,525	0,017*	0,030*	0,113	0,002*
<i>CCNB3</i>	0,158	0,596	0,158	0,001*	0,338	0,002*
<i>CDC2</i>	0,142	0,794	0,044*	0,691	0,304	0,009*

* angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$)

For SiHa var oppgang i transkriptnivå etter en halv time ikke signifikant i noen av tilfellene, noe som kan skyldes at det ble undersøkt for få paralleller. SiHa viste signifikant nedgang for tre gener ved laveste nivå: *PLK1*, *CCNB2* og *CDC2*. Etter 48 timer var ingen av transkriptnivåene signifikant forskjellige fra referansen. Det var heller ingen tendens til forskjell, noe som tydet på at genuttrykket gikk tilbake til nivået for ubestrålte celler.

Heller ikke for HeLa var økningen i transkriptnivå en halv time etter bestråling signifikant. Som nevnt over kan dette skyldes at tre paralleller ikke var tilstrekkelig for å oppnå signifikans. HeLa viste signifikant nedgang for fire gener ved laveste nivå: *PLK1*, *CKS2*, *CCNB2* og *CCNB3*. Det vil si at alle genene unntatt *CDC2* viste signifikant reduksjon i nivå. Etter 48 timer var alle transkriptnivåene signifikant lavere enn for referansen. Dette tydet på at genuttrykket ikke kom tilbake til nivået for ubestrålte celler.

4 Diskusjon

4.1 Metodiske aspekter

4.1.1 Cellelinjer som modellsystem for kreft

I denne oppgaven ble det benyttet to cellelinjer fra livmorhalskreft som modellsystem for kreftformen. Cellelinjene stammer opprinnelig fra biopsier av tumorer fra henholdsvis plateepitelkarsinom og adenokarsinom i cervix [46,47]. Cellene ble dyrket i et kunstig miljø, med kontrollert temperatur, tilgang på næringsstoffer og luftsammensetning. Dette miljøet avviker fra tilstanden inne i en tumor i kroppsvevet. Her er ofte tilgangen på oksygen og næringsstoffer begrenset, noe som påvirker blant annet genekspressjonen [62]. Det er vist at påvirkning av mikromiljøet i en tumor, for eksempel ved hypoksi, bidrar til resistens mot kjemoterapi og strålebehandling. Forskjellene i miljø for celler i tumor og celler i cellelinjer, medfører at resultater fra cellelinjeeksperimenter ikke nødvendigvis er gyldige for celler i vev. Til tross for dette er bruk av cellelinjer i kreftforskning svært nyttig, da slike eksperimenter kan indikere hvilke prosesser det kan være nyttig å undersøke nærmere, og danne hypoteser som senere kan undersøkes i tumorer.

4.1.2 Kolonitellinger

Ved bestemmelse av evne til kolonidannelse og dose-responskurve ble utsådde celler inkubert i 17 dager før kolonitelling. 17 dager ble valgt for å forsikre at det ble dannet kolonier som inneholdt mer enn 50 celler. I litteraturen er det vanligvis brukt inkubasjonstid på 1-2 uker [63,64], men 14-21 dager er også benyttet [65]. Vekstmønsteret til HeLa er som beskrevet i kapittel 3.1, noe annerledes enn SiHa. Da koloniene skulle telles etter 17 dager var SiHa-koloniene små, tette og fine å telle, mens HeLa-koloniene var blitt ganske store og klumpete i utstrekning. Dette gjorde HeLa-koloniene svært vanskelig å telle nøyaktig. Ved bruk av noe kortere inkubasjonstid for HeLa ville sannsynligvis evne til kolonidannelse blitt bestemt med større sikkerhet. Den økte usikkerheten ga større standardfeil for HeLa enn SiHa i kolonidannelseforsøket.

HeLa er tidligere vist å være relativt strålefølsom i forsøk utført på samme måte som i denne oppgaven [65,66]. Ved høye stråledoser måtte det derfor sås ut mange celler for å sikre dannelse av kolonier. Etter bestråling med ioniserende stråling dør HeLa i liten grad ved

apoptose [65], noe som tyder på at cellene hovedsaklig dør ved mitotisk katastrofe [67]. Dette innebærer at etter bestråling er det mange av cellene som greier å dele seg et par ganger, før de stopper opp i cellesyklus. I motsetning til celler som dør av apoptose blir celler som dør på denne måten hengende fast i plasten i celledyrkingsflaskene. Etter 17 dagers inkubering, fulgt av fiksering og farging, ble derfor tellingen vanskelig gjort av at svært mange enkeltceller hadde blitt hengende igjen i flasken og tatt til seg farge. Dette var med på å bidra til usikkerhet i resultatene for HeLa. I motsetning til i kolonidannelseforsøket kom ikke disse usikkerhetene til uttrykk i økt standardfeil for overlevelsesfraksjonene sammenlignet med SiHa.

4.1.3 Mikromatriseteknikken

Protokollen for mikromatriseteknikken som ble brukt i denne oppgaven er tidligere benyttet og publisert ved avdelingen [7,68]. Protokollen er også blitt validert ved å sammenligne dataene med resultater fra tidligere RT-PCR-eksperimenter. I tillegg til en god protokoll er mikromatriseteknikken avhengig av god RNA-kvalitet. RNA-kvaliteten ble i denne oppgaven kontrollert ved hjelp av RNA-kalkulator. Denne kalkulatoren gir i tillegg til RNA-konsentrasjoner et mål på kvaliteten på det isolerte RNA. Målinger av RNA-kvalitet i denne oppgaven var i de aller fleste tilfeller innenfor kravet.

Videre avhenger denne teknikken av kvaliteten på mikromatrisene det hybridiseres på. I denne oppgaven oppstod det en del problemer med kornete bakgrunn ved avbildning av mikromatrisene. Dette har sannsynligvis med prepareringen av mikromatrisene å gjøre. Disse kornene vanskeliggjorde bildeanalysen, og kan ha bidratt til økt usikkerhet i resultatene.

4.1.4 Kvantitativ RT-PCR

For å oppnå pålitelige kvantitativ RT-PCR-resultater er det flere faktorer som må optimaliseres, blant annet [69]:

- RNA-kvalitet
- Bruk av kjemikalier
- Analysemetode

Kvaliteten på RNA ble sikret gjennom spektrofotometriske målinger med RNA-kalkulator, og dette sikrer utgangspunktet for prosedyren. I tillegg til kvaliteten på RNA, korrigeres det ved

hjelp av endogen kontroll i $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden for forskjeller i RNA tilsatt til reaksjonsbrønnene [44], noe som sørger for normalisering av dataene.

I denne oppgaven ble prinsippet for spesifikk deteksjon av amplifikasjonsprosessen brukt [69]. Fordelen med denne typen deteksjon fremfor ikke-spesifikk deteksjon som måler all dannelse av dobbeltrådet DNA, er at uspesifikke hybridiseringer mellom primere (dannelse av primer-dimere) ikke lenger detekteres av fluorescensdetektoren. Dermed sikres det at fluorescensdetektoren kun registrer amplifikasjon av målgenet.

Kvantifisering av relativt genuttrykk ble i denne oppgaven utført ved hjelp av $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden [44]. Metoden baserer seg på å relatere uttrykket av målgenet i prøven til uttrykket i en referanseprøve. Dataene normaliseres ved å korrigere RT-PCR-signalene for de ulike genene ved hjelp av signalene fra et gen som antas å ha et stabilt nivå i cellen. I litteraturen er det anbefalt at det brukes flere slike gener til samme analyse, og at disse genes nivå faktisk er stabilt valideres [69]. I denne oppgaven ble genet *B2M* brukt som eneste referanse. Det har ikke blitt validert om gennivået holdes stabilt under de utførte forsøkene, og dette kan være med på å bidra til usikkerhet i resultatene. *B2M* har imidlertid tidligere blitt benyttet som kontrollgen på avdelingen [7], og også andre har funnet at bruk av *B2M*-genet som endogen kontroll gir gode resultater [44]. Videre styrkes resultatene av at samsvaret mellom parallellene var godt.

I tillegg anbefales det ved bruk av Ct-verdi for kvantifisering at det justeres for variabel bakgrunn [69]. I denne oppgaven ble dette kontrollert ved å kjøre to blankprøver for alle probene på 96-brønners brettet, og i alle de utførte forsøkene var signalet fra disse prøvene tilfredsstillende lavt (ikke detekterbart).

4.2 Biologiske aspekter

4.2.1 Etablering av cellelinjene

For å etablere cellelinjene for strålebiologiske studier, og for å ha et best mulig utgangspunkt for å vurdere resultatene fra studie av genekspresjon etter bestråling, ble det gjort en del innledende eksperimenter med de to cellelinjene SiHa og HeLa.. Det ble bestemt vekstprofil, evne til kolonidannelse, strålefølsomhet og ulikheter i genuttrykk. Det ble det funnet en del

forskjeller mellom de to cellelinjene, først og fremst var det variasjon i vekstmønster og strålefølsomhet.

Vekstprofilen for cellelinjene var noe ulik, som beskrevet i resultatene fra vekstkurveforsøket i kapittel 3.1. Som nevnt så forskjellene ut til å henge sammen med cellelinjenes morfologi. Ved inspeksjon i mikroskop ser cellelinjene like ut ved lav celletetthet, mens det opptrer tydelige forskjeller med økende tetthet. HeLa vokste raskt og enkeltceller slapp tidlig taket når det ble trangt, mens SiHa vokste litt senere, tålte tettere forhold og først når flaskene ble svært fulle slapp mange celler taket i plasten. Det ble funnet en doblingstid på henholdsvis 1,4 døgn (33,6 timer) for SiHa og 0,9 døgn (21,6 timer) for HeLa. Doblingstiden for HeLa var i samsvar med tidligere funn, her ble doblingstiden bestemt til 20 timer [66]. I dette arbeidet var også doblingstiden til SiHa blitt bestemt, men var ikke oppgitt i artikkelen. Men det ble opplyst at SiHa hadde en høyere verdi for doblingstid enn HeLa, og at doblingstiden lå mellom 20 timer og 32 timer. Dette tyder på at HeLa vokser raskere enn SiHa.

Cellelinjenes evne til kolonidannelse (PE) ble bestemt til henholdsvis 45,4 % for SiHa og 48,6 % for HeLa. PE-verdien for HeLa samsvarer godt med tidligere funn, mens verdien for SiHa ligger en del lavere enn forventet [66]. I den tidligere studien ble PE bestemt til 72 % for SiHa og 53 % for HeLa, og det ble i likhet med våre forsøk benyttet MEM-medium med tilsats av 10 % føtalt bovint serum. I tillegg til i kolonidannelseeksperimentet ble det også beregnet PE for ubestrålte celler i dose-responskurveforsøket, som ble brukt til å beregne overlevelsesfraksjonen ved de ulike stråledosene. PE-verdien funnet i dette forsøket for SiHa (0,22) var lavere enn i kolonidannelseforsøket. Her ble det kun beregnet PE for ett bestemt utsådd celleantall, mens det i selve kolonidannelseforsøket ble beregnet et gjennomsnitt fra flere celleantall. Dette kan være noe av forklaringen på avviket i PE, da evne til kolonidannelse kan variere noe med celleantall, selv om det i kolonidannelseforsøket kunne se ut som om PE holdt seg relativt stabil ved ulike celleantall hos SiHa. I tillegg ble de ubestrålte cellene benyttet til bestemmelse av PE i dette stråleforsøket tatt med ut av inkubatoren en periode, mens de øvrige cellene i forsøket ble bestrålt. Dette ble gjort for at kontrollcellene (ubestrålte celler) skulle behandles så likt som de bestrålte cellene som mulig. Dette kan ha påvirket veksten, grunnet endringer i blant annet temperatur og fuktighet.

Ved bestemmelse av strålefølsomhet ble overlevelsesfraksjonen etter stråling i denne oppgaven beregnet ved telling av celler som viste klonogen overlevelse. Det vil si at kun de cellene som greide å dele seg så mange ganger etter bestråling at de dannet en koloni (her: 50 celler eller mer), ble registrert som celler som hadde overlevd. Etter bestråling hender det at noen celler greier å dele seg et par ganger før de enten dør eller stopper opp i cellesyklus, og slike celler vil ikke regnes som overlevende celler. Det ble funnet en overlevelsesfraksjon ved 2 Gy (SF2) på 0,64 for SiHa, og på 0,55 for HeLa. Ved økende stråledoser ble forskjellene i overlevelsesfraksjon større mellom SiHa og HeLa. Disse funnene er i overensstemmelse med tidligere funn i samme type forsøk [65,66]. I disse eksperimentene ble det i begge tilfeller bestemt SF2 for HeLa på 0,53, mens SiHa ble bestemt til henholdsvis 0,73 og 0,58. Også de øvrige overlevelsesfraksjonsdataene var i samsvar med en av disse tidligere undersøkelsene [66]. Til sammenligning ble det der funnet overlevelsesfraksjoner ved henholdsvis 6 Gy og 10 Gy på cirka 0,1 og 0,01. I denne oppgaven ble tilsvarende overlevelsesfraksjoner for SiHa bestemt til 0,2 og 0,02. Våre og tidligere studier tyder på at HeLa er mer strålefølsom enn SiHa.

Ved hjelp av mikromatriser ble eventuelle forskjeller i genuttrykk mellom de to cellelinjene undersøkt, for å se om dette kunne relateres til forskjeller i vekst og strålerespons. Det ble funnet 58 gener som var differensielt uttrykte. Blant disse genene ble det funnet en del gener med interessant biologisk funksjon. Genene *MYC*, *RASSF1*, *KLF6* og *INHBB* var mer uttrykt i HeLa enn i SiHa. Disse genene er involvert i vekst og celleproliferasjon [61], noe som kan være med på å forklare forskjellene i vekstmønster. Også genet *SI00P* ble funnet å være differensielt høyere uttrykt i HeLa enn i SiHa. Dette genet har i en annen undersøkelse vist seg å være oppregulert i adenokarsinomer fra livmorhalskreft [70]. Her ble genuttrykket i klinisk materiale fra adeno- og plateepitelkarsinomer fra cervix undersøkt mot uttrykket i normalvev fra samme område ved hjelp av cDNA-mikromatriser. I denne artikkelen er det også foreslått at nettopp dette genet kan være involvert i utviklingen av adenokarsinomer. I samme undersøkelse ble genet *MYC* funnet å være oppregulert i plateepitelkarsinomer. *MYC*-genet er involvert i cellesyklusarrest og celleproliferasjon [61]. Dette er ikke i overensstemmelse med funnene i denne oppgaven. Her ble det registrert at dette genet var mer uttrykt i HeLa (adenokarsinom) enn i SiHa (plateepitelkarsinom). Dette kan skyldes at det ble brukt ulike metoder for analyse. I denne oppgaven ble de to cellelinjene undersøkt relativt til hverandre, mens i nevnte artikkel sammenlignes karsinomceller med normalceller. I tillegg gjelder ikke nødvendigvis funnene for alle plateepitelkarsinomer. Videre var genene

TNFS7 og *RASSF1* differensielt uttrykte, *TNFS7* mest uttrykt i SiHa og *RASSF1* mest i HeLa. *TNFS7* er involvert i apoptose og celleproliferasjon, mens *RASSF1* er med på Rasprotein signaltransduksjon. Rasproteinet er en negativ regulator av cellesyklus, og er involvert i cellesyklusarrest [61]. I tillegg til de nevnte genene ble det funnet mange andre gener som var differensielt uttrykte, men der funksjonen ikke er like godt kjent. Disse genene kan også ha en viktig funksjon i vekst, tumorutvikling og strålerespons. Det ble ikke funnet forskjeller i genuttrykk for noen av genene som ble undersøkt med kvantitativ RT-PCR (*CKS2*, *PLK1*, *CCNB2*, *CCNB3* og *CDC2*).

Ved undersøkelse av det relative genuttrykket mellom cellene med mikromatriser ble det funnet noen kromosomale områder der flere gener var differensielt uttrykt. Dette kan som nevnt være et tegn på at genene hadde ulikt kopitall i de to cellelinjene, noe som kan ha blitt forårsaket av delesjoner eller amplifikasjoner. Slike genetiske abberasjoner er utbredt i tumorceller [10], og kan være et ledd i utviklingen av kreft. Ved undersøkelse av klinisk materiale er det tidligere funnet amplifikasjoner for henholdsvis 16q og 17q i celler fra plateepitelkarsinomer, og det ble funnet tilsvarende delesjoner i celler fra adenokarsinomer [71]. Dette kan være med på å forklare at det ble funnet flere gener på 16q og 17q som var mer uttrykt i SiHa (plateepitelkarsinom) enn i HeLa (adenokarsinom). I samme undersøkelse ble SiHa undersøkt med hensyn på kromosomale abberasjoner [71]. Her ble det funnet tap av regionen 16q22.1-23.1. I denne oppgaven ble det funnet flere gener som var differensielt høyere uttrykt i SiHa i forhold til HeLa i nettopp denne regionen. Dermed kan disse observasjonene av områder med flere differensielt uttrykte gener skyldes andre årsaker enn ulikheter i kopitall. I denne oppgaven ble det ikke gjort spesifikke undersøkelser av kopitall, det ble kun observert relative forskjeller mellom to cellelinjer.

4.2.2 G₂/M-faseovergangen

Når SiHa og HeLa bestråles med 8 Gy ioniserende stråling arresterer cellene i G₂-fasen i cellesyklus. Arresten er signifikant etter 8 timer i SiHa og etter 4 timer i HeLa, og er størst etter henholdsvis 30 og 24 timer for SiHa og HeLa. Denne midlertidige stansen i cellesyklus oppheves gradvis, noe som vises gjennom et økt antall celler i G₁- og S-fase ved tidspunkter senere enn dette [56].

Ved undersøkelse av transkriptnivået for de fem utvalgte genene i denne oppgaven (*PLK1*, *CKS2*, *CCNB2*, *CCNB3* og *CDC2*) ble det observert en tendens til økning en halv time etter

bestråling av cellene, men økningen var ikke signifikant. *PLK1* og *CKS2* er tidligere vist å være høyere uttrykt i G₂-fase enn i S-fase [72], og det kan tenkes at dette også gjelder for andre gener spesifikt involvert i reguleringen av inngangen til mitose. Det kan derfor spekuleres i at økningen i transkriptnivå skyldes at celler i G₂-fasen ved bestråling ikke kan forsette inn i mitosen (beskrevet i kapittel 1.4.2). Siden disse cellene holdes tilbake i G₂, kan det tenkes at transkripsjonsnivået øker grunnet endringer i cellesyklusfordeling. Denne endringen i cellesyklusfordeling kan skje før genuttrykket rekker å bli regulert som følge av bestrålingen. Som nevnt ble tendensen til oppgang sett for alle genene i begge cellelinjene, men oppgangen var ikke signifikant i noen av tilfellene. I dette arbeidet ble det undersøkt tre paralleller for hvert tidspunkt. Det kan tenkes at dette antallet var for lavt til å fastslå at oppgangen var signifikant, og mer arbeid må gjøres dersom dette skal vises.

I perioden mellom 4 og 8 timer etter bestråling ble det i dette arbeidet målt nedgang i nivå for alle de undersøkte genene i begge cellelinjene. En slik nedgang i genuttrykk for noen av disse genene er også beskrevet flere andre steder [54,55,72,73]. En forbigående nedgang i uttrykk av cellesykluskontroll-gener, blant annet *CDC2* og *CCNB*, etter behandling av lymfomcellelinjen U-937 med 20 Gy ioniserende stråling er tidligere rapportert [73]. Her ble det gjort RNA-stabilitets studier som viste at nedgangen delvis skyldtes nedgang i transkriptets halveringstid. Dette viser at posttranskripsjonell regulering kan være involvert i nedgangen. Hemming av mRNA for *PLK1* er også tidligere beskrevet for brystkreftcellelinjen MT-1 etter bestråling med 8 Gy [55]. Her var *PLK1*-transkriptnivået kraftig redusert etter 6 timer, men var nesten tilbake til utgangspunktet etter 12 timer. Den samme tendensen i genuttrykk ble observert for *PLK1* hos cellelinjene undersøkt i denne oppgaven. Effekten av DNA-skade på uttrykket av gener involvert i G₂/M-overgangen i HeLa-celler er tidligere undersøkt, og også her ble *PLK1* funnet å være nedregulert [72]. Nedgang i transkriptnivå kan skyldes nedregulering og nedsatt stabilitet av mRNA [73]. En slik nedgang i transkriptet fra gener nødvendig for inngang til mitose, kan være en del av forklaringen på at cellene stanser opp i G₂-fasen av cellesyklus [72]. I denne oppgaven ble det funnet at *CKS2*-genet var signifikant nedregulert i HeLa, men i SiHa var den observerte nedgangen ikke signifikant. Det kan tenkes at tendensen til nedgang i transkriptnivå hadde blitt signifikant også for *CKS2* dersom flere paralleller hadde blitt undersøkt.

Etter at laveste nivå ble registrert, økte transkriptnivået igjen i begge cellelinjene. Den observerte G₂-arresten etter 8 Gy var forbigående i begge cellelinjene [56]. Derfor kan økningen i transkriptnivå for de undersøkte genene være et tegn på at cellene begynte å gjøre seg klare til å proliferere. Tendensen til økning i transkriptnivå etter laveste nivå var lik for alle genene.

Ved tidspunktene senere enn 24 timer etter bestråling ble det funnet forskjeller i utvikling av transkriptnivået mellom de to cellelinjene. Mens ingen av de målte nivåene for SiHa 48 timer etter bestråling var signifikant forskjellige fra nivået hos ubestrålte celler, var alle disse signifikant lavere enn hos ubestrålte celler i HeLa. Ut fra kurvene så det ut til at det relative genuttrykket hos HeLa begynte å stige etter lavest målte nivå, før de igjen sank. Ved undersøkelse av cellesyklusfordeling etter bestråling er det tidligere vist at G₂-arresten oppheves tidligere i HeLa enn i SiHa [56]. Forskjellene i utviklingen i genuttrykk etter 24 og 48 timer kan derfor skyldes at HeLa-cellen begynte å proliferere tidligere enn SiHa-cellen, og at det 48 timer etter bestråling var en ulik cellesyklusfordeling i de to cellelinjene. I begge cellelinjene gikk andelen celler i G₂ ned, mens andelen i G₁ økte ved tidspunkter etter 24 timer, men utviklingen skjedde tidligere hos HeLa enn hos SiHa. Dermed kan det tenkes at det relative genuttrykket av gener som er høyt uttrykt i G₂-fasen vil synke. Transkriptnivået for *CKS2* var som for de øvrige genene tilbake til utgangspunktet i SiHa, mens i HeLa var nivået etter 48 timer signifikant lavere enn nivået i ubestrålte celler.

Ved undersøkelse av genuttrykket etter bestråling for de utvalgte genene, viste det seg at endingene i ekspresjon var relativt like for alle genene. En del gener involvert i overgangen mellom G₂- og M-fase er undersøkt i museembryo-fibroblaster etter strålebehandling [54]. Det ble også vist at som respons på DNA-skaden som oppstod ble blant andre følgende gener nedregulert på samme måte: *PLK1*, *CDC2*, *CDC25C*, *CKS2* og *CCNB2*. Det ble undersøkt om denne tilsynelatende like reguleringen kunne skyldes likheter i promotorstruktur. Det ble der funnet at følgende gener som har blitt diskutert i denne oppgaven har likheter i sin promotor: *CDC2*, *CDC25C*, *CCNB2* og *PLK1*. Dersom mekanismen bak reguleringen av flere gener involvert i inngangen til mitose er lik, kan det forklare at tendensen i genuttrykk for de undersøkte genene i denne oppgaven virker å være den samme. Dersom cellen oppdager skader i DNA, som gjør at kontrollsystemet ønsker å stanse progresjonen gjennom cellesyklus, virker det sannsynlig at å regulere flere gener involvert i progresjonen samtidig gjennom felles promotorstruktur fremfor å regulere hvert gen enkeltvis vil være mer effektivt.

Funnene kan tyde på at uttrykket av *CKS2*-genet reguleres på samme måte som flere andre gener involvert i samme signalvei. Et interessant funn er at både i SiHa og HeLa ble laveste nivå for *CCNB2* og *CCNB3* registrert ved et senere tidspunkt enn de øvrige genene, ved 8 timer i begge cellelinjene. Dette kan tyde på at disse genene reguleres noe forskjellig fra de andre, og mer arbeid må til for å kartlegge betydningen av dette funnet.

4.3 Videre arbeid

I klinisk materiale er høyt uttrykk av *CKS2*-genet vist å være forbundet med dårlig respons på behandling med ioniserende stråling. Arbeidet i denne oppaven er begynnelsen på kartleggingen av *CKS2*, og en del andre gener involvert i samme signalvei, sin rolle i regulering av cellyklus og i strålerespons. Dersom strålesensitiviteten kan økes ved å hemme *CKS2*-uttrykket, vil dette kunne danne grunnlag for utvikling av strålesensitiverende stoffer målrettet mot celler med høyt uttrykk av *CKS2*. Dette skal i fremtiden undersøkes ved å manipulere genuttrykket i cellelinjene ved hjelp av siRNA. Mer arbeid skal også legges ned i å undersøke funksjonen og stråleresponsen til flere gener involvert i samme signalvei som *CKS2*, slik som for eksempel *CCNB1* og *CDC25C*. Undersøkelse av *CCNB1* vil kunne være med på å bekrefte antakelsen om at denne formen for *CCNB* ikke er den viktigste i cervix.

Videre vil det også være viktig å relatere uttrykket av *CKS2* og andre interessante gener til uttrykk og funksjon til proteinproduktene. Det er proteinene som til sist utøver effekten i cellene, og proteiner kan reguleres posttranskripsjonelt. Derfor er det viktig å kartlegge eventuelle endringer i proteinnivå for *CKS2* og andre proteiner i samme signalvei, og sammenligne dette med de observerte endringene i uttrykk av genene. Deretter må det forsøkes å knytte eventuelle funn til cellenes strålerespons.

Fortsatt gjenstår mye arbeid for å kartlegge funksjonen og stråleresponsen for gener og proteiner involvert i G₂/M-fasen i cellyklus hos celler fra livmorhalskreft. Forhåpentligvis vil arbeidet i fremtiden kunne være med på å forbedre effekten og spesifisiteten av strålebehandling på kreftcellene hos den enkelte pasient med livmorhalskreft, noe som i tillegg vil kunne skåne det nærliggende vevet.

5 Konklusjon

Det ble funnet forskjeller i morfologi, vekstprofil og strålerespons mellom de to undersøkte cellelinjene fra livmorhalskreft, SiHa og HeLa. Ved undersøkelse av relativt genuttrykk ble det også funnet en del differensielt uttrykte gener, noe som kan være med på å forklare de observerte forskjellene mellom cellelinjene. Utvalgte gener involvert i inngangen til mitose (*CKS2*, *PLK1*, *CCNB2*, *CCNB3* og *CDC2*) ble undersøkt ved ulike tidspunkter etter bestråling med 8 Gy. For alle de undersøkte genene i begge cellelinjene ble det funnet en tendens til nedgang i genuttrykk etter bestråling. Grad av nedgang og ved hvilket tidspunkt laveste nivå ble målt, varierte både mellom genene og mellom cellelinjene. *CKS2*-transkriptet viste signifikant nedgang etter bestråling i HeLa, mens i SiHa ble det bare observert en tendens. Disse funnene indikerer at regulering av gener som kreves for inngang til mitose påvirkes av strålebehandling. Tendensen i utviklingen av genuttrykk fulgte hovedsaklig samme mønster i alle genene, deriblant *CKS2*. Dette kan tyde på at genene reguleres likt.

Referanser

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; **80**: 827-841.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; **55**: 74-108.
3. Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1030-1038.
4. Einhorn N, Trope C, Ridderheim M, Boman K, Sorbe B, Cavallin-Stahl E. A systematic overview of radiation therapy effects in cervical cancer (cervix uteri). *Acta Oncol* 2003; **42**: 546-556.
5. Levine EL, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick C, Wilks DP, Potten CS, Hendry JH, Hunter RD, . Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995; **37**: 1-9.
6. Ree AH. Cellesyklus som terapeutisk angrepspunkt. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2004; **124**: 2479-2482.
7. Lyng H, Brovig RS, Svendsrud DH, Holm R, Kaalhus O, Knutstad K, Oksefjell H, Sundfor K, Kristensen GB, Stokke T. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics* 2006; **7**: 268.
8. Egan EA, Solomon MJ. Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3659-3667.
9. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential Cell Biology*. New York: Garland Publishing, Inc., 1998.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 2002.
11. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; **36**: 131-149.
12. Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 2000; **12**: 405-411.
13. Pines J. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 55-63.

14. Urbanowicz-Kachnowicz I, Baghdassarian N, Nakache C, Gracia D, Mekki Y, Bryon PA, Ffrench M. cks expression is linked to cell proliferation in normal and malignant human lymphoid cells. *Int J Cancer* 1999; **82**: 98-104.
15. Pines J. Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* 1996; **6**: 1399-1402.
16. Spruck CH, de Miguel MP, Smith AP, Ryan A, Stein P, Schultz RM, Lincoln AJ, Donovan PJ, Reed SI. Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science* 2003; **300**: 647-650.
17. Isaka K, Nishi H, Osakabe Y, Miyata M, Hokamura M, Nakada T, Itokazu O, Takayama M. Establishment of a HPV and p53-mutation-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2004; **92**: 15-21.
18. Hall E. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
19. Anatomy of the uterus.
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19263.htm> . 19-10-2006.
MedlinePlus. 19-10-2006.
20. Kreft i Norge 2004. <http://www.kreftregisteret.no/ramme.htm?start.htm> . 19-10-2006.
Kreftregisteret. 19-10-2006.
21. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J* 2002; **43**: 722-728.
22. Kesis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 3988-3992.
23. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; **63**: 1129-1136.
24. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 5523-5527.
25. Kuzuya K. Chemoradiotherapy for uterine cancer: current status and perspectives. *Int J Clin Oncol* 2004; **9**: 458-470.
26. Smith R, Kao GD. Pictures, progress, and perplexities: the immediate cell biological effects of ionizing radiation. *Cancer Biol Ther* 2004; **3**: 602-607.
27. Belli M, Sapora O, Tabocchini MA. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res (Tokyo)* 2002; **43 Suppl:S13-9**: S13-S19.

28. Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003; **22**: 5792-5812.
29. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; **22**: 5834-5847.
30. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59**: 928-942.
31. van Vugt MA, Smits VA, Klompmaaker R, Medema RH. Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *J Biol Chem* 2001; **276**: 41656-41660.
32. Cerciello F, Hofstetter B, Fatah SA, Zaghloul M, Odermatt B, Bodis S, Varga Z, Pruschy M, Ciernik IF. G2/M cell cycle checkpoint is functional in cervical cancer patients after initiation of external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; **62**: 1390-1398.
33. Kao GD, McKenna WG, Muschel RJ. p34(Cdc2) kinase activity is excluded from the nucleus during the radiation-induced G(2) arrest in HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34779-34784.
34. Xu B, Kim ST, Lim DS, Kastan MB. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 1049-1059.
35. Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, Reis EM, Neves EJ, de Souza SJ, Carvalho AF, Brentani H, Reis LF. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; **54**: 95-105.
36. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* 2002; **48**: 1170-1177.
37. Mello-Coelho V, Hess KL. A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38**: 1543-1552.
38. White CA, Salamonsen LA. A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology. *Reproduction* 2005; **130**: 1-13.
39. Lyng H, Badiie A, Svendsrud DH, Hovig E, Myklebost O, Stokke T. Profound influence of microarray scanner characteristics on gene expression ratios: analysis and procedure for correction. *BMC Genomics* 2004; **5**: 10.
40. Fielden MR, Halgren RG, Dere E, Zacharewski TR. GP3: GenePix post-processing program for automated analysis of raw microarray data. *Bioinformatics* 2002; **18**: 771-773.
41. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 2002; **32 Suppl:496-501**: 496-501.

-
42. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; **27**: 95-125.
 43. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med* 2003; **9**: 189-195.
 44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
 45. American Type Culture Collection. <http://www.atcc.org/?siteRedirectOverride=y> . 2006. ATCC. 8-11-2006.
 46. LGC Promochem; SiHa. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=HTB-35> . 2006. LGC Promochem. 19-10-2006.
 47. LGC Promochem; HeLa. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-2> . 2006. LGC Promochem. 19-10-2006.
 48. Begg AC, Steel G.G. Cell proliferation and growth rate of tumours. In: Steel GG (editor). *Basic Clinical Radiobiology*. New York: Edward Arnold (Publishers) Ltd., 2002.
 49. *GeneQuant RNA/DNA Calculator User Manual*. Amersham Pharmacia Biotech, 2000.
 50. Mikromatrisekonsortiet. <http://www.microarray.no/index.php?section=1> . 6-11-2006. The Norwegian Microarray Consortium. 6-11-2006.
 51. *Fairplay Microarray Labeling Kit Instruction Manual*. Stratagene, 2006.
 52. *HybArray 12 Hybridization Station User manual*. PerkinElmer, 2003.
 53. *Agilent Microarray Scanner System User Manual (v.6.3)*. Agilent Technologies, 2003.
 54. Jackson MW, Agarwal MK, Yang J, Bruss P, Uchiumi T, Agarwal ML, Stark GR, Taylor WR. p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1821-1832.
 55. Ree AH, Bratland A, Nome RV, Stokke T, Fodstad O. Repression of mRNA for the PLK cell cycle gene after DNA damage requires BRCA1. *Oncogene* 2003; **22**: 8952-8955.
 56. Caspersen E. Cell cycle distribution and CKS2 protein content in cervical carcinoma cell lines after exposure to ionizing radiation. 2006. Hovedfagsoppgave Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF/Universitetet i Oslo.
 57. *Absolute Quantification Getting Started Guide for the 7300/7500 Real Time PCR System*. Applied Biosystems, 2004.

58. *GenePix Pro 6.0 User's Guide and Tutorial*. Axon Instruments, 2004.
59. BASE. <http://base.thep.lu.se/> . 2006. Universitetet i Lund. 6-11-2006.
60. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006; **27**: 126-139.
61. Source. <http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch> . 19-10-2006. Stanford University. 19-10-2006.
62. Denko N, Schindler C, Koong A, Laderoute K, Green C, Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 480-487.
63. Griffith TD, Tolmach LJ. Lethal response of HeLa cells to x-irradiation in the latter part of the generation cycle. *Biophys J* 1976; **16**: 303-318.
64. Kim KY, Seol JY, Jeon GA, Nam MJ. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell. *Cancer Lett* 2003; **189**: 157-166.
65. Sheridan MT, West CM. Ability to undergo apoptosis does not correlate with the intrinsic radiosensitivity (SF2) of human cervix tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; **50**: 503-509.
66. Banath JP, Macphail SH, Olive PL. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 2004; **64**: 7144-7149.
67. Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001; **4**: 303-313.
68. Lyng H, Landsverk KS, Kristiansen E, DeAngelis PM, Ree AH, Myklebost O, Hovig E, Stokke T. Response of malignant B lymphocytes to ionizing radiation: gene expression and genotype. *Int J Cancer* 2005; **20;115**: 935-942.
69. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; **15**: 155-166.
70. Chao A, Wang TH, Lee YS, Hsueh S, Chao AS, Chang TC, Kung WH, Huang SL, Chao FY, Wei ML, Lai CH. Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *Int J Cancer* 2006; **119**: 91-98.
71. Wilting SM, Snijders PJ, Meijer GA, Ylstra B, van d, I, Snijders AM, Albertson DG, Coffa J, Schouten JP, van de Wiel MA, Meijer CJ, Steenbergen RD. Increased gene copy numbers at chromosome 20q are frequent in both squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *J Pathol* 2006; **209**: 220-230.

72. Crawford DF, Piwnica-Worms H. The G(2) DNA damage checkpoint delays expression of genes encoding mitotic regulators. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37166-37177.
73. Datta R, Hass R, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Down-regulation of cell cycle control genes by ionizing radiation. *Cell Growth Differ* 1992; **3**: 637-644.

Vedlegg

- Vedlegg 1: Løsninger
- Vedlegg 2: Kjemikalieoversikt
- Vedlegg 3: Protokoll for isolering av RNA etter TRIzolprosedyren
- Vedlegg 4: Protokoll for syntese av cDNA til cirka 10 cm² hybridiseringsoverflate for mikromatriseeksperimenter
- Vedlegg 5: Protokoll for farging og vasking av cDNA til mikromatriseeksperimenter og til kvantitativ RT-PCR-eksperimenter
- Vedlegg 6: Protokoll for cDNA-syntese til kvantitativ RT-PCR
- Vedlegg 7: RNA-kvalitet for prøver brukt til mikromatriseeksperimenter
- Vedlegg 8: Differensielt uttrykte gener mellom cellelinjene
- Vedlegg 9: Avvik mellom parallelle brønner i kvantitativ RT-PCR

Vedlegg 1

Løsninger

- *EDTA 500 mM oppløsning*
 - 18,61 g EDTA
 - 60 ml sterilt vann
 - pH justeres til 7,5-8 med 2 M NaOH
 - Sterilt vann til 100 ml
- *1 x TE buffer pH 8*
 - 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 1 mM EDTA
 - Autoklaveres
- *LiCl-oppløsning til RNA utfelling*
 - 160 µl 5 M LiCl
 - 8 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6-8)
 - 4 µl 0,5 M EDTA
 - 28 µl renset vann
- *20 x SSC Buffer*
 - 175,3 g NaCl
 - 88,2 g natrium citrat
 - 800,0 ml sterilt vann
 - pH justeres til 7,0 med et par dråper 10 N NaOH
 - Renset vann til 1 liter
- *1 M Tris-HCl pH 6-8*
 - 12,1 g Tris-base
 - 100 ml sterilt vann
 - pH justeres med konsentrert saltsyre
- *3M NaAc pH 5,2*
 - 408,3 g natriumacetate*3H₂O
 - Løses i 800 ml sterilt vann
 - pH justeres til 5,2 med 100 % eddiksyre
 - Fylles opp til 1 liter med sterilt vann
 - Steriliseres ved autoklaving
- *Komasinblå*
 - Metanol 50 %
 - Eddiksyre 10 %
 - Komasinblå 0,1 %
 - Renset vann q.s.

Vedlegg 2

Kjemikalieoversikt

<i>Kjemikalie</i>	<i>Produsent</i>
Dulbecco's Modified Eagles Medium	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA
L-glutamin, 200MM, 100x	Gibco, Paisley, Skottland
Penicillin/Streptomycin, 100x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Østerrike
Føtalt Bovint Serum	Gibco, Paisley, Skottland
Trypsin-EDTA, 1x	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, Tyskland
Saltvannsoppløsning 9 mg/ml	Fresenius Kabi, Hamburg, Tyskland
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kloroform (Triklormetan pro anlysi)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Isopropanol (2-propanol pro anlysi)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Sterilt vann	Fresenius Kabi, Hamburg, Tyskland
Oligo d(T) primer, 500 ng/µl	Stratagene®, La Jolla, USA
Superscript 5x First Strand buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
20 x dNTP mix med aminoallyl dUTP	Stratagene®, La Jolla, USA
dNTP nukleotider, 100 mM	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
RNaseblock, 40 U/µl	Stratagene®, La Jolla, USA
Superscript™ Reverse Transcriptase III	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glykogen 35 µg/µl	Qbiogene/MP Biomedicals, Illkirch, Frankrike
Glykogen 20 µg/µl	Stratagene®, La Jolla, USA
2 x koblingsbuffer	Stratagene®, La Jolla, USA
Cot-1 Human DNA 1 µg/µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA/Roche, Branchburg, USA
Humant β2M primermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dulbeccos PBS uten Ca og Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Østerrike
Cy™3/5 mono-Reactive Dye Pack	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Saltsyre 37%	Merck, Darmstadt, Tyskland
NaOH pelleter	Merck, Darmstadt, Tyskland
DNA-bindende løsning	Stratagene®, La Jolla, USA
Coomassie Violet R200 (komasinblå)	Fluka Chemie, Buchs, Sveits
GeneTac High Stringency Wash Buffer	Proteomic Solutions, Saint Marcel, Frankrike
GeneTac Medium Stringency Wash Buffer	Proteomic Solutions, Saint Marcel, Frankrike
GeneTac Postwash Buffer	Proteomic Solutions, Saint Marcel, Frankrike
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Litium klorid	Serva, New York, USA
EDTA	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA
Natriumklorid	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA

Natriumcitrat	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA
SlideHyb #3 (hybridiseringsbuffer)	Ambion,
Etanol (Absolutt alkohol/Antibac)	Arcus Kjemi., Norge
Eddiksyre 100 %	Merck, Darmstadt, Tyskland
0,1 M DTT	Stratagene®, La Jolla, USA
CKS2 primermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
CCNB2 primermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
CCNB3 primermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
PLK1 primermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
CDC2 primermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Poly d(A) ₄₀₋₆₀ , 8 µg/µl	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Trizma Base	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA
Natriumacetat	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA

Vedlegg 3

Protokoll for isolering av RNA etter TRIzolprosedyren

1. Homogenisering

- Tilsett 6 ml TRIzol til hver prøve.
- Overfør prøvene til 15 ml rør.

2. Fase separering

- Prøvene inkuberes i 10 minutter ved romtemperatur, slik at nukleoproteinkompleksene får løse seg fullstendig.
- Tilsett deretter 1,2 ml kloroform. Rist/vend rørene i 15 sekunder, og inkuber i 2-3 minutter ved romtemperatur.
- Rørene sentrifugeres ved 5500 rpm i 30 minutter ved 4°C. Løsningene separeres i en nedre, rød, fenolkloroformfase, en interfase, og en øvre fargeløs vannfase. Vannfasene utgjør cirka 60 % og inneholder RNA. Vannfasene overføres til nye rør.

3. Utfelling av RNA

- Tilsett 3 ml isopropanol for å felle ut RNA. Bland ved å vende rørene. Inkuber prøvene i romtemperatur i 10 minutter.
- Sentrifuger ved 5500 rpm i 20 minutter ved 4°C. RNA blir synlig som en hvitaktig pellett.
- Sug av supernatanten.
- Resuspender og løs RNA pelletten godt i 200 µl TE.
- Overfør løsningen til Eppendorfrør.
- Tilsett 32 µl 5M Litiumklorid og bland godt.
- Inkuber på is i minst 3 timer, helst over natt.
- Sentrifuger ved 12000 rpm i 30 minutter ved 4°C.
- Sug av supernatanten. RNA utgjør en geleaktig pellet som nesten ikke er synlig.

4. Vask av RNA

- Tilsett 1 ml kald 70% EtOH for å vaske RNA.
- Vortex og sentrifuger ved 12000 rpm i 5 minutter ved 4°C. Sug av supernatanten.
- Gjenta vaskingen.

5. Resuspending av RNA

-Lufttørk RNA ved å sette rørene opp-ned på et tørkepapir i noen minutter. Det er viktig at RNA-pelletten ikke tørker helt ut, da det vil minke løseligheten.

-Løs RNA i 10-30 µl H₂O.

-Inkuber prøvene i 10 minutter ved 57°C hvis de er vanskelig å løse.

-RNA-konsentrasjon og -kvalitet måles ved hjelp av RNA-kalkulator.

-Frys RNA så raskt som mulig og lagre ved -80°C.

Vedlegg 4

Protokoll for syntese av cDNA til cirka 10 cm² hybridiseringsoverflate for mikromatriseeksperimenter

1. Tillaging av RNA-løsning

- Overfør den mengden løsning beregnet fra konsentrasjonen til isolert RNA som gir 20 µg RNA over i RNasefrie rør, to rør per prøve ved bruk av to paralleller. Det tilsettes sterilt vann opptil 12 µl.
- Tilsett 1 µl 500 ng/µl oligo d(T).
- Inkuber ved 70 °C i 10 minutter, kjøøl deretter på is inntil videre bruk.

2. Tillaging av enzym- og nukleotidløsning

- Bland per tillagde rør med RNA-løsning i punkt 1 følgende i RNase/DNase-fritt rør:
 - 4 µl SuperScript x 5 buffer
 - 1 µl 20 x dNTP mix (inkludert amino allyl dUTP)
 - 1,5 µl 0,1 M DTT
 - 0,5 µl RNase block (40U/µl)
- 7 µl av løsningen blandes med RNA-løsning fra punkt 1.
- La blandingen stå på is.

3. Tilsetning av enzym, cDNA syntese

- Tilsett 2 µl SuperScript RT III (200U/µl).
- Inkuber ved 46 °C i 2 timer.
- Tilsett 10 µl 1M NaOH for å denaturere RNA-tråden.
- Inkuber ved 70 °C i 10 minutter.
- Kjøøl sakte ned i romtemperatur
- Sentrifuger med bordsentrifuge for å fjerne kondens.
- Tilsett 10 µl 1M HCL for å nøytralisere løsningen.

4. Opprensing av cDNA

- Tilsett til cDNA-løsning i rekkefølge:
 - 4 µl 3M NaAc pH 5,2

- 1 µl 20 mg/ml glycogen (eventuelt 35 mg/ml)
- 100 µl iskald 95 % EtOH

-Inkuber ved -20 °C over natt.

-Sentrifuger ved 13000 rpm i 45 minutter ved 4 °C. Kast supernatant.

5. Vask av cDNA

-Tilsett 0,5 ml iskald 70 % EtOH for å vaske pellet.

-Sentrifuger ved 13000 rpm i 15 minutter ved 4 °C. Kast supernatant.

-Sug av all løsning. Sentrifuger raskt med bordsentrifuge, og sug av eventuelle rester av løsning med 10 µl spiss.

-Varm i åpent rør på 37 °C varmeblokk i 2-3 min, slik at all EtOH fjernes.

-Pellet går fra hvit til lys rosa/gjennomsiktig. Pelleten må ikke overtørkes.

Vedlegg 5

Protokoll for farging og vasking av cDNA til mikromatriseeksperiment

Arbeidet utføres på halvmørk lab, og prøvene dekkes til med sølvfolie.

1. Tilsetning av fluorescerende fargestoff

- Tilsett til cDNA-pellet 5 µl 2 x koblingsbuffer. Bufferen varmes i cirka 5 min på 37 °C først, for å resuspendere bunnfall. Sjekk at alt er løst før bruk.
- Sentrifuger raskt ned med bordsentrifuge og inkuber ved 37 °C i 15 minutter for å løse pellet ordentlig.
- Tilsett 5 µl romtemperert farge (Cy3/Cy5) og bland forsiktig med pipette opp og ned.
- Inkuber ved romtemperatur i 60 minutter under sølvfolie.

2. Tillaging av DNA-bindende blanding

- Bland per cDNA-rør:
 - 200 µl DNA-bindende løsning
 - 200 µl 70% romtemperert EtOH
- Bland godt ved vortexing. Blandingen må være homogen ved bruk. Vortex også rett før bruk.

3. Tilsetning av DNA-bindende blanding til cDNA

- Tilsett til farget cDNA 90 µl romtemperert 1 x TE-buffer pH 8.
- Bland deretter cDNA og 200 µl DNA-bindende blanding per rør.
- Overfør blanding til microspinkolonne fra Fairplay Kit (Stratagene, La Jolla, USA).
- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Kast eluat.
- Tilsett nye 200 µl DNA-bindende blanding
- Overfør blandingen til kolonnen etter vortexing.
- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Kast eluat, cDNA sitter fast i kolonnen.

4. Vask av cDNA

- Tilsett til kolonnen 750 µl 75 % romtemperert EtOH.

- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Kast eluat.
- Gjenta vask ved å tilsette til kolonnen 750 µl 75 % romtemperert EtOH.
- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Kast eluat.
- Sentrifuger på nytt ved 13000 g ved 17 °C i 30 sekunder for å fjerne ytterligere vaskeløsning.
- Overfør kolonnen til rent eppendorfrør.

5. Eluering av cDNA

- Tilsett 54 µl 10mM Tris base, pH 8,5 til kolonnen.
- Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur.
- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Overfør eluat tilbake til toppen av kolonnen.
- Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur.
- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Overfør eluat tilbake til toppen av kolonnen.
- Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur.
- Sentrifuger ved 13000 rpm ved 17 °C i 30 sekunder.
- Ta vare på eluatet, kast kolonnene.

6. Blanding av farget cDNA som skal kjøres mot hverandre

- Fukt Microcon YM30 kolonne (Millipore, Billerica, USA) med 500 µl TE og sentrifuger i 6 minutter.
- Bland eluat fra samhørende Cy5 og Cy3 prøver og overfør til YM30 kolonnen.
- Tilsett 16 µl Cot-1 DNA.

7. Oppkonsentrering av cDNA

- Konsentrer prøvene ned til under 10 µl ved å sentrifugere rørene med YM30 kolonnene inntil det kan suges av 3-5 µl. Vend kolonnen deretter motsatt vei i et nytt rør, og eluer prøven ut ved å sentrifugere ved 13000 rpm i 1 minutt.
- Tilsett 1,7 µl Poly A (8 µg/µl).
- La prøvene stå på is og mørkt frem til videre bruk.

8. Blanding med hybridiseringsbuffer

-Bland:

- Cirka 3-5 µl merket cDNA.
- 115 µl 65 °C hybridiseringsbuffer.

-Varm opp til 99 °C i 4 minutter.

-Lagres på 46 °C frem til bruk. Behold varm buffer for eventuell etterfylling av kammer.

Vedlegg 6

Protokoll for cDNA-syntese til kvantitativ RT-PCR

1. Tillaging av RNA-løsning

- Utfra konsentrasjonen til isolert RNA, overføres den mengden løsning som gir 2 µg RNA over i RNasefrie rør, ett rør per prøve. Det tilsettes sterilt vann opptil 12 µl.
- Tilsett 1 µl 500 ng/µl oligo d(T).
- Inkuber ved 70 °C i 10 minutter, kjøøl deretter på is inntil videre bruk.

2. Tillaging av enzym- og nukleotidløsning

- Bland per tillagde rør med RNA-løsning i punkt 1 følgende i RNase/DNase-fritt rør:
 - 4 µl SuperScript x 5 buffer
 - 1 µl 20 x dNTP mix (10 mM av hvert nukleotid)
 - 1,5 µl 0,1 M DTT
 - 0,5 µl RNase block (40U/µl)
- 7 µl av løsningen blandes med RNA-løsning fra punkt 1.
- La blandingen stå på is.

3. Tilsetning av enzym, cDNA syntese

- Tilsett 2 µl SuperScript RT III (200U/µl).
- Inkuber ved 46 °C i 2 timer.
- Tilsett 10 µl 1M NaOH for å denaturere RNA-tråden.
- Inkuber ved 70 °C i 10 minutter.
- Kjøøl sakte ned i romtemperatur.
- Sentrifuger med bordsentrifuge for å fjerne kondens.
- Tilsett 10 µl 1M HCL for å nøytralisere løsningen.
- Tilsett 158 µl dH₂O for å oppnå en konsentrasjon på 10 ng/µl.
- Før utsåing i 96-brønners brett fortynnes prøven ytterligere, slik at konsentrasjonen blir 1 ng/µl.

Vedlegg 7

RNA-kvalitet for prøver brukt til mikromatriseeksperimenter*SiHa mot HeLa*

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
SiHa kontroll	2,021	3,64
HeLa kontroll	2,051	3,64

SiHa kontroll mot kontroll

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll SiHa	2,021	3,64

HeLa kontroll mot kontroll

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll HeLa	2,08	5,10

RNA kvalitet for prøver brukt til kvantitativ RT-PCR-eksperimenter*Parallell 1 SiHa*

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll	2,161	2,24
0,5 timer	2,127	1,68
4 timer	2,067	2,52
6 timer	2,139	2,24
8 timer	2,111	1,40
12 timer	2,092	1,96
24 timer	2,087	2,80
Kontroll 30 og 48t	2,000	2,24
30 timer	2,043	3,92
48 timer	2,015	3,78

Parallell 2 SiHa

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll	2,020	3,36
0,5 timer	2,026	2,24
4 timer	2,049	2,52
6 timer	2,110	2,38
8 timer	2,127	2,52
12 timer	2,052	3,22
24 timer	2,114	2,94
Kontroll 30 og 48t	2,046	2,80
30 timer	2,027	3,22
48 timer	2,059	4,06

Parallell 3 SiHa

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll	1,913	1,26
0,5 timer	1,865	1,26
4 timer	1,949	1,68
6 timer	1,968	2,24
8 timer	2,017	2,24
12 timer	2,037	2,38
24 timer	2,006	3,92
Kontroll 30 og 48t	2,016	2,66
30 timer	2,034	4,76
48 timer	2,047	4,90

Parallell 1 HeLa

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll	2,068	4,62
0,5 timer	2,064	3,36
4 timer	2,054	2,10
6 timer	2,069	3,92
8 timer	2,112	5,32
12 timer	2,097	2,38
24 timer	2,058	4,20
Kontroll	2,002	3,92
30 timer	2,018	4,06
48 timer	2,033	4,06

Parallell 2 HeLa

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll	2,025	4,76
0,5 timer	2,043	2,80
4 timer	2,023	3,92
6 timer	2,039	4,06
8 timer	2,059	4,62
12 timer	2,064	4,62
24 timer	2,073	5,04
30 timer	2,026	5,46
48 timer	2,050	3,64

Parallell 3 HeLa

Prøve	Ratio 260/280	Konsentrasjon µg/µl
Kontroll	2,039	4,20
0,5 timer	2,036	2,80
4 timer	2,030	2,38
6 timer	2,018	2,38
8 timer	2,068	2,80
12 timer	2,039	4,48
24 timer	2,039	5,18
30 timer	2,029	5,18
48 timer	2,030	2,80

Vedlegg 8

Differensielt uttrykte gener mellom cellelinjene

Differensielt uttrykte gener etter undersøkelse ved mikromatrise, HeLa mot SiHa					
<i>Reporter ID</i>	<i>Gensymbol</i>	<i>Cytoband</i>	<i>Beskrivelse</i>	<i>Relativt genuttrykk (log₂)</i>	<i>Kjent funksjon</i>
Mer uttrykt i SiHa					
175536	GABRD	1p	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta	-3,48	
25k_814378	SPINT2	19q13.1	Serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	-3,44	Cellemotilitet
2583307	TXNRD2	22q11.21	Thioredoxin reductase 2	-3,39	
25k_898221	NR4A2	2q22-q23	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	-3,34	Antimikrobiell humoral respons
366315	LOC93343	19p13.11	Hypothetical protein BC011840	-2,63	
66317	HIST1H1C	6p21.3	Histone 1, H1c	-2,27	
1500000	HIST1H2BD	6p21.3	Histone 1, H2bd	-2,12	
85840	NNMT	11q23.1	Nicotinamide N-methyltransferase	-2,04	
814798	ALDH1A3	15q26.3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-1,93	Alkohol metabolisme
782760	CYP1B1	2p21	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-2,02	Elektron transport
1916687	TNFSF7	19p13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	-1,91	Apoptose
25k_183602	KRT14	17q12-q21	Keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)	-1,83	
824510	CGI-128	16q22.1-q22.3	CGI-128 protein	-1,78	
25k_897774	APRT	16q24	Adenine phosphoribosyltransferase	-1,75	
25k_810019	HNRPD	4q21.1-q21.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	-1,74	
769537	ECH1	19q13.1	Enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	-1,73	

810131	KRT19	17q21.2	Keratin 19	-1,73	
25k_49630	CACNA1D	3p14.3	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	-1,73	
46415	CASKIN2	17q25.1	CASK interacting protein 2	-1,72	
25k_841470	CTSH	15q24-q25	Cathepsin H	-1,72	
813387	NQO1	16q22.1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	-1,68	
299388	NUTF2	16q22.1	Nuclear transport factor 2	-1,67	
755599	IFITM1	11p15.5	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	-1,65	Celle overflate reseptor linket signal transduksjon
299664	C14orf147	14q13.1	Chromosome 14 open reading frame 147	-1,61	
25k_212496	MAN2A1	5q21-q22	Mannosidase, alpha, class 2A, member 1	-1,61	
Mer uttrykt i HeLa					
810036	NCOA2	8q13.3	Nuclear receptor coactivator 2	1,59	
50562	C8orf4	8p11.2	Chromosome 8 open reading frame 4	1,61	
133273	PMP22	17p12-p11.2	Peripheral myelin protein 22	1,63	
25k_826173	PFN1	17p13.3	Profilin 1	1,63	
25k_769959	COL4A2	13q34	Collagen, type IV, alpha 2	1,65	
25k_897956	PRAME	22q11.22	Preferentially expressed antigen in melanoma	1,69	
25k_812965	MYC	8q24.12-q24.13	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	1,70	Cellessyklus arrest
754358	SPOCK	5q31	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	1,73	
25k_840990	GSTM4	1p13.3	Glutathione S-transferase M4	1,73	
193892	PEG10	7q21	Paternally expressed 10	1,73	
143887	PRSS23	11q14.1	Protease, serine, 23	1,74	
25k_1456962	ARPC4	3p25.3	Actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	1,74	Aktin filament polymerisering
25k_1323448	CRIP1	14q32.33	Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	1,78	Antibakteriell humoral respons
341328	TPM1	15q22.1	Tropomyosin 1 (alpha)	1,78	
25k_323599	INHBB	2cen-q13	Inhibin, beta B (activin AB beta polypeptide)	1,85	Celle differensiering

284100	COLEC12	18pter-p11.3	Collectin sub-family member 12	1,85	Antibakteriell humoral respons
628529	UCP3	11q13	Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	1,85	
67055			HepG2 partial cDNA, clone hmd5d04m5.	1,93	
66686		Xq28	In multiple clusters	1,96	
810813	S100A2	1q21	S100 calcium binding protein A2	2,06	
547058	CCNG1	5q32-q34	Cyclin G1	2,10	Cytokinese
25k_898281	FLNA	Xq28	Filamin A, alpha (actin binding protein 280)	2,11	
898092	CTGF	6q23.1	Connective tissue growth factor	2,16	DNA metabolisme
42070	NT5E	6q14-q21	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	2,18	
25k_79629	CXCR4	2q21	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2,23	
771308	ALDH3B2	11q13	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	2,26	Alkohol metabolisme
25k_813757	FOLR2	11q13.3-q13.5	Folate receptor 2 (fetal)	2,26	
25k_510381	KLF6	10p15	Kruppel-like factor 6	2,55	B-celle differensiering
769959	COL4A2	13q34	Collagen, type IV, alpha 2	2,67	
866866	RASSF1	3p21.3	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	2,73	Ras protein signal transduksjon
291880	MFAP2	1p36.1-p35	Microfibrillar-associated protein 2	2,77	
856314	S100P	4p16	S100 calcium binding protein P	2,80	
131839	FOLR1	11q13.3-q14.1	Folate receptor 1 (adult)	2,86	
1636447	GNG11	7q31-q32	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	3,72	G-protein koblet reseptor protein signalisering

Vedlegg 9

Avvik mellom parallelle brønner i kvantitativ RT-PCR*SiHa B2M*

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,090	0,128	0,008
Kontroll brett 2	0,019	0,011	0,089
Kontroll 2	0,102	0,043	0,022
0,5 timer	0,141	0,229	0,015
4 timer	0,018	0,206	0,334
6 timer	0,080	0,069	0,005
8 timer	0,338	0,177	0,046
12 timer	0,036	0,060	0,190
24 timer	0,169	0,266	0,038
30 timer	0,006	0,023	0,091
48 timer	0,143	0,018	0,093

SiHa CCNB2

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,085	0,060	0,112
Kontroll brett 2	0,039	0,080	0,365
Kontroll 2	0,008	0,194	0,041
0,5 timer	0,011	0,582	0,138
4 timer	0,071	0,018	0,234
6 timer	0,149	0,517	0,458
8 timer	0,271	0,075	0,360
12 timer	0,065	0,039	0,009
24 timer	0,005	0,022	0,176
30 timer	0,064	0,045	0,015
48 timer	0,046	0,206	0,033

SiHa CcNB3

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,136	0,215	0,380
Kontroll brett 2	0,112	0,550	0,448
Kontroll 2	0,587	0,320	0,694
0,5 timer	0,056	0,445	0,431
4 timer	0,288	0,306	0,372
6 timer	0,265	0,004	0,043
8 timer	0,023	0,154	0,431
12 timer	0,058	0,657	0,581
24 timer	0,354	0,290	0,191
30 timer	0,114	0,469	0,069
48 timer	0,182	0,290	0,061

SiHa CDC2

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,029	0,019	0,010
Kontroll brett 2	0,115	0,396	0,015
Kontroll 2	0,179	0,035	0,024
0,5 timer	0,112	0,029	0,128
4 timer	0,052	0,043	0,245
6 timer	0,065	0,028	0,160
8 timer	0,033	0,072	0,511
12 timer	0,092	0,076	0,155
24 timer	0,029	0,121	0,028
30 timer	0,000	0,086	0,213
48 timer	0,031	0,557	0,007

SiHa PLK1

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,084	0,039	0,129
Kontroll brett 2	0,205	0,228	0,024
Kontroll 2	0,065	0,026	0,131
0,5 timer	0,061	0,765	0,351
4 timer	0,170	0,305	0,356
6 timer	0,138	0,187	0,259
8 timer	0,125	0,238	0,148
12 timer	0,033	0,369	0,040
24 timer	0,096	0,285	0,003
30 timer	0,046	0,634	0,355
48 timer	0,316	0,851	0,277

SiHa CKS2

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll	0,064	0,164	0,086
Kontroll 2	0,157	0,120	0,044
0,5 timer	0,005	0,328	0,033
4 timer	0,019	0,144	0,012
6 timer	0,059	0,442	0,245
8 timer	0,038	0,442	0,154
12 timer	0,071	0,104	0,036
24 timer	0,039	0,015	0,075
30 timer	0,023	0,257	0,160
48 timer	0,064	0,043	0,048

HeLa B2M

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,495	0,003	0,023
Kontroll brett 2	0,037	0,004	0,078
Kontroll 2	0,048		
0,5 timer	0,061	0,084	0,002
4 timer	0,043	0,004	0,012
6 timer	0,042	0,000	0,119
8 timer	0,066	0,001	0,017
12 timer	0,071	0,013	0,044
24 timer	0,100	0,000	0,045
30 timer	0,017	0,071	0,137
48 timer	0,025	0,007	0,021

HeLa CCNB2

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,043	0,119	0,050
Kontroll brett 2	0,076	0,013	0,021
Kontroll 2	0,197		
0,5 timer	0,360	0,009	0,039
4 timer	0,020	0,005	0,016
6 timer	0,89	0,105	0,056
8 timer	0,272	0,042	0,058
12 timer	0,197	0,001	0,014
24 timer	0,097	0,053	0,082
30 timer	0,050	0,374	0,050
48 timer	0,049	0,027	0,127

HeLa CCNB3

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,123	0,148	0,222
Kontroll brett 2	0,685	0,041	0,044
Kontroll 2	0,055		
0,5 timer	0,531	0,253	0,067
4 timer	0,032	0,033	0,090
6 timer	0,208	0,132	0,087
8 timer	0,119	0,091	0,527
12 timer	0,060	0,155	0,081
24 timer	0,078	0,136	0,014
30 timer	0,304	0,436	0,040
48 timer	0,232	0,074	0,348

HeLa CDC2

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,056	0,025	0,030
Kontroll brett 2	0,060	0,035	0,030
Kontroll 2	0,080		
0,5 timer	0,393	0,057	0,059
4 timer	0,018	0,022	0,041
6 timer	0,117	0,011	0,018
8 timer	0,006	0,024	0,004
12 timer	0,054	0,038	0,026
24 timer	0,057	0,040	0,089
30 timer	0,167	0,311	0,187
48 timer	0,023	0,019	0,032

HeLa PLK1

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,084	0,025	0,105
Kontroll brett 2	0,181	0,014	0,013
Kontroll 2	0,352		
0,5 timer	0,365	0,094	0,214
4 timer	0,178	0,071	0,011
6 timer	0,200	0,116	0,216
8 timer	0,032	0,002	0,070
12 timer	0,094	0,114	0,023
24 timer	0,028	0,236	0,110
30 timer	0,184	0,140	0,012
48 timer	0,043	0,358	0,422

HeLa CKS2

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll brett 1	0,143	0,009	0,017
Kontroll brett 2		0,063	0,176
Kontroll 2	0,308		
0,5 timer	0,085	0,058	0,057
4 timer	0,052	0,155	0,145
6 timer	0,077	0,072	1,017
8 timer	0,065	0,084	0,070
12 timer	0,029	0,031	0,009
24 timer	0,061	0,015	0,003
30 timer	0,000	0,191	0,224
48 timer	0,092	0,250	0,101

SiHa B2M (Brukt ved undersøkelse av CKS2 kontroll-24 timer)

Prøve	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Kontroll	0,090	1,374	0,021
0,5 timer	0,046	0,004	0,017
4 timer	0,091	0,049	0,076
6 timer	0,095	0,079	0,076
8 timer	0,068	0,074	0,034
12 timer	0,053	0,038	0,118
24 timer	0,027	0,121	0,037

HeLa B2M (Brukt ved undersøkelse av CKS2 kontroll-24 timer repetisjon 1)

Prøve	Rep.1
Kontroll	0,084
0,5 timer	0,069
4 timer	0,024
6 timer	0,029
8 timer	0,037
12 timer	0,039
24 timer	0,053

Kommentarer til vedlegg 9:

- Det ble målt verdier for Ct mellom 20 og 36.
- I de aller fleste tilfeller ble det sådd ut to parallelle brønner for de undersøkte genene. Unntaket er repetisjon 1, 2 og 3 for CKS2 i SiHa, og repetisjon 1 for CKS2 i HeLa. Her ble det sådd ut tre parallelle brønner.
- Undersøkelse av tidspunktene 30 og 48 timer ble i enkelte tilfeller ikke undersøkt samtidig med resten av prøvene. I disse tilfellene ble det brukt en egen kontroll for disse tidspunktene, kalt kontroll 2. Unntak er repetisjon 2 og 3 for alle genene i HeLa.